

Versuche zur Entwicklung von Antidepressiva aus Psychotonika

— Pharmakologie, Wirkungsmechanismus und Biotransformation
von N-L-Phenylalanyl- β -phenylalkylaminen —

Dieter Beck

1978



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Versuche zur Entwicklung von Antidepressiva aus
Psychotonika
-Pharmakologie, Wirkungsmechanismus und Biotrans-
formation von N-L-Phenylalanyl- β -phenylalkylaminen-

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München



vorgelegt von
Dieter Beck
aus Neuburg/Donau

München 1978



1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Schönenberger

2. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Eiden

Tag der mündlichen Prüfung: 1. 12. 1978

Meiner Frau

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität durchgeführt.

Die Anregung zu dieser Arbeit erhielt ich von

Herrn Professor Dr. H. S c h ö n e n b e r g e r
dem ich für die wissenschaftliche Anleitung und Betreuung zu
großem Dank verpflichtet bin.

Herrn Professor Dr. F. Eiden, Herrn Professor Dr. H. -D. Stachel
und Herrn Professor Dr. T. Severin, Vorstände des Instituts für
Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität München, danke
ich für das mir entgegengebrachte persönliche Interesse und
Wohlwollen.

Ferner gilt mein Dank Herrn Professor Dr. H. Wagner, Institut
für pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München,
der mir einen Arbeitsplatz im Isotopenlabor zur Verfügung stellte,
und Herrn Professor Dr. J. Hölzl, unter dessen wissenschaftlicher
Anleitung ich meine Versuche mit markierten Substanzen durch-
führte.

Zu großem Dank bin ich Herrn Professor Dr. A. Petter, Institut
für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der tierärztlichen
Fakultät der Universität München, für seine Hilfsbereitschaft
und wissenschaftliche Anleitung bei den pharmakologischen Unter-
suchungen, verpflichtet.

Besonderen Dank schulde ich außerdem der Firma Klinge, München,
die es mir ermöglichte meine Studien zur Ganztier-Autoradio-
graphie in ihrem Isotopenlabor durchzuführen und mir dabei die
entsprechenden Geräte zur Verfügung stellte.

Gliederung

	Seite
A. Einleitung	1
B. Pharmakologische Untersuchungen zur antidepressiven Wirkung von N-L-Phenylalanyl- β -phenylalkylaminen	3
I. Versuchsplanung	3
II. Lokalanästhetische Wirkung	5
III. Wirkung am isolierten Vas deferens der Ratte	7
IV. Beeinflussung der Hexobarbitalnarkose	21
V. Antagonisierung der Reserpinwirkung	27
VI. Oxotremorinantagonismus	30
VII. Beeinflussung des Kampftriebes männlicher, isolierter Mäuse	33
VIII. Beeinflussung der Spontanmotilität	35
IX. Hemmung der Monaminoxidase in Vitro	40
X. Spasmolyse am isolierten Jejunum der Ratte	45
XI. Bestimmung der akuten Toxizität	56
C. Untersuchungen zu Pharmakokinetik und Metabolismus von N-L-Phenylalanyl-L-2-amino-1-phenylpropan (13) und L-2-Amino-1-phenylpropan (3)	58
I. Versuchsplanung	58
II. Modifizierte Synthese zur Herstellung von ^{14}C -N-L-Phenylalanyl-L-2--amino-1-phenylpropan im Mikromaßstab	60
III. Optimierung eines DC-Systems zur Auftrennung von 3, 13 und seinen Metaboliten aus physiologischem Material	62
IV. In vitro-Stabilitätsprüfungen	65
V. Bestimmung der renalen und rectalen Eliminationsrate von 13	66

VI.	Ganztier-Autoradiographie von 13 und 3	69
VII.	Quantitative Verteilung von 13 in verschiedenen Organen der Maus zu unterschiedlichen Zeiten nach i. p. Applikation	76
VIII.	Bestimmung der Gesamtaktivität im Gehirn und Blutplasma zu unterschiedlichen Zeiten nach i. p. Applikation von 13 und 3	80
IX.	Bestimmung von Metabolitenfraktionen im Gehirn	87
D.	Experimenteller Teil	91
I.	Methodik der pharmakologischen Prüfungen	91
	1. Lokalanästhetische Wirkung	91
	2. Untersuchungen am isolierten Vas deferens der Ratte	91
	3. Beeinflussung der Hexobarbitalnarkose	92
	4. Antagonisierung der Reserpinwirkung	93
	5. Oxotremorinantagonismus	94
	6. Beeinflussung des Kampftriebes isolierter, männlicher Mäuse	94
	7. Prüfung der Spontanmotilität	94
	8. Hemmung der Monaminoxidase in vitro	96
	9. Spasmolyse am isolierten Rattenjejunum	96
	10. Bestimmung der akuten Toxizität	97
II.	Modifizierte Synthesevorschrift zur Herstellung von ^{14}C -N-L-Phenylalanyl-L-2-amino-1-phenylpropan	98
III.	Analytische Methoden	100
IV.	Stabilitätsprüfungen von 13 in vitro	101
	1. In künstlichem Magensaft	101
	2. In künstlichem Darmsaft	101

3. Im 9000 g-Überstand von Mäuseleber-homogenat	101
4. Nach Inkubation mit Amino-peptidase M (EC 3.4.11.2) aus Schweinenieren	102
V. Methodik der Untersuchungen zu Pharmakokinetik und Metabolismus von 13 bzw. 3	104
1.) Rectale und renale Eliminations-rate	104
2.) Ganztier-Autoradiographie	104
3.) Verteilung in verschiedenen Organen und Körperflüssigkeiten	106
4.) Bestimmung von Metabolitenfraktionen im Gehirn	107
E. Zusammenfassung	109
F. Literaturverzeichnis	111

A. Einleitung

Nach Untersuchungen unseres Arbeitskreises entstehen durch amidartige Verknüpfung von Ephedrin und Amphetamin mit Aminosäuren Lokalanästhetika (63), die in einigen Fällen noch die pressorischen Eigenschaften ihrer Ausgangsamine aufweisen (63). Sie ähneln in ihrem Wirkungsbild dem Cocain, das nach Matussek et al. (48) auf Grund seiner pharmakologischen Eigenschaften den Antidepressiva nahesteht.

Für das Wirkungsbild der Antidepressiva werden in erster Linie indirekte adrenomimetische Effekte (Noradrenalinpotenzierung) und daneben lytische Wirkungsqualitäten verantwortlich gemacht (35). Die lytische Wirkungskomponente soll eine Modulierung und Verstärkung der antidepressiven Wirkung hervorrufen (35).

Der Mechanismus der adrenotropen Wirkung von Antidepressiva ist cocainartig, d.h., sie blockieren die Rückresorption von freigesetztem Noradrenalin (NA). Cocain zeigt im Tierversuch ein ähnliches pharmakologisches Wirkungsspektrum wie Antidepressiva (8). In einer Dosierung, die noch keine Erregung hervorruft, hemmt Cocain die durch Reserpin ausgelöste Sedation und verursacht gleichzeitig eine für Antidepressiva charakteristische Erregung mit kompulsiver Komponente (10). Cocain zeigt neben adrenotropen Eigenschaften auch lytische Allgemeinwirkungen, wie sie für Antidepressiva beschrieben werden.*

*Für Lokalanästhetika wie Cocain werden häufig solche Eigenschaften aus dem lytischen Wirkungsspektrum, z.B. analgetische, antiadrenerge, anticholinerge, antihistaminartige, antikonvulsive, chinidinartige, lissive, spasmolytische und vasodilatatorische Effekte beschrieben (91). Lokalanästhetika sind als unspezifische Lytika anzusehen, die sich an ubiquitären reaktiven Stellen membranöser Zellstrukturen (Membranproteine (52)) anlagern und so ihre Wirkung entfalten. Die lokalanästhetische, d.h. leitungsblockierende Qualität stellt nur eine von mehreren lytischen Eigenschaften (in diesem Fall dominierend) eines Lokalanästhetikums dar.

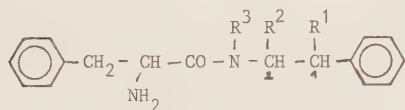
Die Ähnlichkeit des pharmakologischen Wirkungsspektrums von Cocain mit dem therapeutisch gebräuchlicher Antidepressiva und das schon erwähnte gleichzeitige Auftreten pressorischer und lokalanästhetischer Wirkungsqualitäten bei einigen N-Aminoacyl- β -phenylalkylaminen (63) waren der Anlaß, eingehende Untersuchungen in dieser Stoffklasse mit dem Ziel der Auffindung neuer Antidepressiva und der Aufklärung des Wirkungsmechanismus durchzuführen.

B. Pharmakologische Untersuchungen zur antidepressiven Wirkung von N-L-Phenylalanyl- β -phenylalkylaminen

B/I Versuchsplanung

In die Untersuchungen wurden die in Tabelle 1 aufgeführten N-L-Phenylalanyl- β -phenylalkylamine 11 - 20 einbezogen. Sie enthalten als Aminkomponente die adrenotropen Amine 2-Amino-1-phenyläthan (1), DL-2-Amino-1-phenyläthan-1-ol (2), L-(+)-Amphetamin (3), L-(+)-Methamphetamin (4), D-(-)-Norephedrin (5), L-(+)-Norpseudoephedrin (6), D-(-)-Ephedrin (7), L-(+)-Ephedrin (8), D-(-)-Pseudoephedrin (9) oder L-(+)-Pseudoephedrin (10).

Tab. 1



Verb. Nr.	adrenotrope Komponente Nr.	R ¹	R ²	R ³	Konfiguration	
					C-1	C-2
11	1	H	H	H	DL	
12	2	OH	H	H		
13	3	H	CH ₃	H		L
14	4	H	CH ₃	CH ₃		L
15	5	OH	CH ₃	H	D	L
16	6	OH	CH ₃	H	L	L
17	7	OH	CH ₃	CH ₃	D	L
18	8	OH	CH ₃	CH ₃	L	D
19	9	OH	CH ₃	CH ₃	D	D
20	10	OH	CH ₃	CH ₃	L	L

Phenylalanin als Aminosäurekomponente wurde benutzt da:

1. die lytischen Wirkungsqualitäten bei N-Phenylalanyl- β -phenylalkylaminen im Vergleich zu aliphatischen Aminosäurederivaten deutlich stärker ausgeprägt sind und
2. Phenylalanin als wirksames Antidepressivum beschrieben ist (27, 51).

Um festzustellen, ob die amidartige Verknüpfung der Amine 1 - 10 mit L-Phenylalanin zu Lokalanästhetika mit adrenotropen Eigenschaften führt, wurden 11 - 20 am Ventrikelstreifen des Froschherzens bei pH 7,3 auf leitungshemmende Wirkung (B/II) und am Vas deferens der Ratte zur Feststellung möglicher adrenomimetischer Eigenwirkung, indirekter adrenomimetischer und NA-verstärkender Wirkung (B/III) geprüft.

Für die Testung der Verbindungen 11 - 20 wurde weiterhin die Beeinflussung der Hexobarbitalnarkose (B/IV) und der Reserpinantagonismus (B/V) herangezogen. Beide Verfahren sind für die pharmakologische Bewertung neuer Antidepressiva wichtig (10).

Thymoleptika zeigen eine unterschiedliche Beeinflussung der Hexobarbitalschlafzeit (21, 76). Entweder führen sie wie Desipramin zu keiner Veränderung der Narkosedauer, oder sie verlängern wie Imipramin die Schlafzeit (Überwiegen der lytischen gegenüber der adrenotropen Wirkungskomponente?).

Thymoleptika schützen Versuchstiere gegen die kataleptische Wirkung des Reserpins.

Verbindungen, die in einem der Tests B/II - B/V Hinweise auf lytische und adrenomimetische Wirkungsqualitäten lieferten (13 - 18), wurden weiterhin auf zentrale anticholinerge Eigenschaften (Oxotremorinantagonismus B/VI und Aggressionsverhalten B/VII, Maus) geprüft.

Zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus der wirksamsten Vertreter (13, 14) und zu ihrer abschließenden pharmakologischen Bewertung wurde auf Beeinflussung der Spontanmotilität (B/VIII, Maus), MAO-Hemmung (B/IX) und Spasmolyse (B/X, Rattenjejunum) geprüft.

Die akute Toxizität (B/XI) wurde für die Verbindungen 13 - 18 bestimmt.

B/II Lokalanästhetische Wirkung

Die Verbindungen 11 - 20 wurden am Ventrikelstreifen des Froschherzens bei $\text{pH} = 7,3$ getestet. 13 - 20 beeinflussen deutlich und in vergleichbarem Ausmaß die Geschwindigkeit der Reizfortleitung. Sie nimmt mit der Einwirkungsdauer bis zum Erreichen einer maximalen Hemmwirkung ab. Keine oder nur eine geringfügige Wirkung zeigen 11 und 12. Zum Wirkungsvergleich wurden die Konzentrationen herangezogen, die nach 30 min. Einwirkungszeit eine 50proz. Hemmung der Leitungsgeschwindigkeit bewirken. Es wurde eine Abhängigkeit der Wirkung von der Art der Substituenten R^{1-3} festgestellt.

Der schwach leitungshemmende unsubstituierte Grundkörper 11 ($\text{R}^{1-3}=\text{H}$) erfährt eine etwa 100fache Wirkungssteigerung durch Methylsubstitution in 2-Stellung. Der Einfluß einer Hydroxylsubstitution in 1-Stellung und einer Methylsubstitution am N (R^3) ist weniger gravierend. Eine Hydroxylierung in 1-Position führt mit Ausnahme von 12 (vgl. 13 mit 16) zu einer leichten Abschwächung der Wirkung (vgl. 13 mit 15, 16, 17 und 20). Das gleiche bewirkt ausgenommen 13 (vgl. 13 mit 14), eine Methylierung des Stickstoffs (R^3) (vgl. 15 mit 17 und 16 mit 20).

Die bei Diastereomeren beobachteten Wirkungsunterschiede überschreiten nicht den Faktor 2 - 3 (vgl. 15 und 16 sowie 17 - 20).

Die amidartige Verknüpfung von L-Phenylalanin mit den adrenotropen Aminen 1 - 10 führte also in 80 % der Fälle zu Verbindungen mit lytischen Wirkungsqualitäten. Ihre leitungshemmende Wirkung ist stärker als die von Procain (etwa 2 - 7 mal), jedoch erheblich schwächer als die von Percain und Falicain.

Tab. 2: Hemmung der Erregungsleitung im Ventrikelstreifen des Froschherzens
durch N-L-Phenylalanyl- β -phenylalkylamine (65)

Verb. Nr.	adrenotrope Komponente Nr.	R ¹	R ²	R ³	Konfiguration		ID ₅₀ 10 ⁻⁶ Mol/l
					C-1	C-2	
11	1	H	H	H			5500
12	2	OH	H	H	DL		*
13	3	H	CH ₃	H		L	60
14	4	H	CH ₃	CH ₃		L	31
15	5	OH	CH ₃	H	D	L	69
16	6	OH	CH ₃	H	L	L	31
17	7	OH	CH ₃	CH ₃	D	L	96
18	8	OH	CH ₃	CH ₃	L	D	32
19	9	OH	CH ₃	CH ₃	D	D	71
20	10	OH	CH ₃	CH ₃	L	L	70
Procain							228
Falicain							0,7
Percain							0,5

* Keine Hemmung bis 280×10^{-6} Mol/L

B/III Wirkung am isolierten Vas deferens der Ratte

Zur Feststellung möglicher adrenomimetischer Eigenwirkungen, indirekter adrenomimetischer und NA-verstärkender Wirkungen wurden 11 - 20 am Vas deferens der Ratte geprüft. Nur 13 zeigte eine Eigenwirkung. Es erreicht in einer Konzentration von 10^{-4} Mol/l etwa 30 % der maximalen NA-Wirkung. 17 und 18 führen in einer Konzentration von 10^{-5} Mol/l, 13, 15 und 16 in einer solchen von 10^{-6} Mol/l zu einer Verstärkung der NA-Wirkung. 14, 19 und 20 zeigen im Konzentrationsbereich 10^{-4} - 10^{-6} Mol/l keine Verstärkung der NA-Wirkung; 14 ruft im Gegenteil eine Abschwächung hervor. 11 und 12 ergeben in Dosen von 10^{-5} und 10^{-6} Mol/l ebenfalls keinen NA-steigernden Effekt; bei 10^{-4} Mol/l kommt es jedoch zu einer rhythmischen Fibrillation des Organs. Der gleiche Effekt wurde von Ohlin und Strömblad (49) nach Acetylcholin, Kaliumchlorat und Calciumverminderung am Vas deferens der Ratte beobachtet. Die Verbindungen 13, 16 und 18 verursachen eine supra-maximale Steigerung der NA-Wirkung, eine Erscheinung, die auch bei Cocain beschrieben ist. Barnett und Mitarb. (6) erklären diese Potenzierungseffekte mit einer Beseitigung der für NA bestehenden Autoinhibition auf postsynaptischer Ebene.

Die Auswertung der kumulativen Dosis-Wirkungs-Kurven ergibt die Wirkungsabstufung $13 > 16 > 15 > 17 > 18$. Der Vergleich von 11 - 20 läßt folgende Beziehungen zwischen Struktur und NA-verstärkender Wirkung erkennen:

Die geringe Wirkung von 11 und 12 (bei 10^{-4} Mol/l), die wegen der rhythmischen Fibrillation nicht auswertbar ist, wird durch Substitution von Methyl in Position 2 erheblich verstärkt (vergl. 11 mit 13, 12 mit 15 und 16). Die Substitution von Methyl am N (R^3) bedingt eine deutliche Abnahme oder den Verlust der NA-Potenzierung (vgl. 15 mit 17, 16 mit 20 und 13 mit 14). Die Substitution einer Hydroxylgruppe in Position 1 (R^1) führt zu unterschiedlichen Ergebnissen: zu einer Steigerung beim Übergang von 14 (unwirksam) zu 17, zu einem Gleichbleiben der Wirkung beim Übergang von 13 in 15 oder 16 und von 14 in 20. Sehr gravierend ist der Einfluß der Konfiguration auf die Wirkung: von den Diastereomeren sind 17 und 18 wirksam, 19 und 20 jedoch unwirksam.

Die wirksamsten Verbindungen 13, 15 und 16 sind bezüglich ihrer NA-verstärkenden Wirkung mit Cocain vergleichbar, sie sind jedoch schwächer wirksam als Desipramin.

Zusammenfassend können wir also sagen, daß durch amidartige Verknüpfung mit L-Phenylalanin alle Ausgangsbasen (1 - 10) mit Ausnahme von Amphetamin ihre adrenomimetische Wirkung verlieren. Die NA-verstärkenden Effekte, die bei 15 - 18 erhalten bleiben, zeigen, daß diese Verbindungen zwar den NA-Transport unterbinden, selbst aber nicht zu einer Freisetzung von NA führen. Im Gegensatz zur leitungshemmenden Wirkung, die mit Ausnahme von 11 und 12 bei allen Substanzen vergleichbar ist, stellt die NA-verstärkende Wirkung erheblich höhere strukturelle Anforderungen für die Beziehung von Wirksubstrat. Geringfügige strukturelle (vgl. 18 und 14) und sterische (vgl. 17 und 18 mit 19 und 20) Unterschiede führen bereits zu Wirkungsverlust.

Über den Wirkungsmechanismus indirekt wirkender Adrenomimetica und NA-verstärkender Verbindungen bestehen folgende Vorstellungen: NA wird aktiv durch die Zellmembran in das Zytoplasma transportiert. Von dort gelangt es in die chromaffinen Granula und weiter in die dort liegenden Vesikeln. Es wird in den Vesikeln in Form eines Komplexes gespeichert. NA- und Na^+ -Transport sind miteinander gekoppelt. Beide Vorgänge sind vom Funktionieren der Na^+ , K^+ -aktivierten Membran-ATPase abhängig (4). β -Phenylalkylamine kompetitieren mit NA um den "Carrier" und behindern so den NA-Transport durch die neuronale Membran. Daneben wird auch in schwächerem Ausmaß der NA-Transport durch die Vesikelmembran beeinflusst. Sehr starke Inhibitoren des NA-Transports sind z.B. L-2-Amino-1-phenylpropan (3), D(-)-Ephedrin (7) und 2-Amino-1-phenyläthan (1) (4). Hemmstoffe, die selbst nicht transportiert werden, zeigen keine indirekt adrenomimetischen Eigenschaften; sie führen aber zu einer Potenzierung der NA-Wirkung, wie im Falle von 15 - 18. Strukturell nahe verwandte Verbindungen des NA (Tyramin, Ephedrin) (13), die das Transportsystem selbst benutzen und NA im Speicherkomplex ersetzen können, behindern ebenfalls die NAAufnahme. Sie verstärken die NA-Wirkung. Daneben zeigen sie aber auch eine indirekt adrenomimetische Wirkung, die auf einer (stöchiometrischen) Verdrängung von NA aus den membrannahegele-

genen Granula ("leicht verfügbare granuläre Speicher") beruht (13). Die Wirkung von 13 beruht möglicherweise auf einem derartigen Mechanismus. Adrenotrope Verbindungen, die als transportable Substrate des "NA-Carriers" fungieren, lassen sich durch Substitution sperriger Reste am Stickstoff in nicht transportable Hemmstoffe überführen (4). Diese zeigen keine indirekten adrenomimetischen Eigenschaften. Sie wirken NA-potenzierend und sind damit bezüglich der adrenotropen Wirkung dem Desipramin ähnlich (37, 78). Bei Verknüpfung der Adrenomimetika 5 - 8 mit L-Phenylalanin wurde das gleiche Ergebnis erzielt. Die neuen Verbindungen 15 - 18 sind nicht mehr adrenomimetisch wie ihre Ausgangsbasen, sondern zeigen rein NA-verstärkenden Effekt.

Damit wäre die angestrebte Modulierung der adrenergen Wirkungsqualität (Verlust der erregenden Komponente) bei gleichzeitigem Auftreten lytischer Eigenschaften erreicht (Übergang von einer psychostimulierenden zur thymoleptischen Wirkungsqualität). Die neuen Verbindungen würden somit in ihrem pharmakologischen Wirkungsspektrum den Antidepressiva entsprechen.

Tab. 3: Mittelwerte ($\bar{x}$) der relativen Kontraktionshöhen in % mit ihren Standardabweichungen unter Einwirkung von N-L-Phenylalanyl-L-2-amino-1-phenylpropan (13) am Vas deferens der Ratte

Noradrenalin $x \cdot 10^{-8}$ Mol/l	relative Kontraktionshöhe	
	ohne Substanz	mit Substanz 13 $3,35 \times 10^{-6}$ Mol/l
x = 7,68	2,4 $\pm$ 0,6	4,5 $\pm$ 0,6 **
15,37	3,8 $\pm$ 1,0	11,5 $\pm$ 0,6 **
30,74	6,8 $\pm$ 1,7	20,9 $\pm$ 1,4 **
61,47	11,9 $\pm$ 2,7	35,9 $\pm$ 1,4 **
122,95	22,4 $\pm$ 3,3	57,3 $\pm$ 0,6 **
245,89	37,7 $\pm$ 3,0	77,5 $\pm$ 1,4 **
491,78	55,5 $\pm$ 2,5	95,9 $\pm$ 2,1 **
983,56	76,1 $\pm$ 2,0	108,9 $\pm$ 2,0 **
1967,13	90,8 $\pm$ 1,7	115,3 $\pm$ 2,2 **
3934,26	97,7 $\pm$ 0,7	119,9 $\pm$ 2,5 **
7868,04	100,0	121,1 $\pm$ 2,8 **

** Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,01$

Tab. 4: Mittelwerte ($\bar{x}$) der relativen Kontraktionshöhen in % mit ihren Standardabweichungen unter Einwirkung von N-L-Phenylalanyl-D-norephedrin (15) am Vas deferens der Ratte

Noradrenalin $x \cdot 10^{-8}$ Mol/l	relative Kontraktionshöhen	
	ohne Substanz	mit Substanz 15 $3,35 \times 10^{-6}$ Mol/l
x = 7,68	0,34 $\pm$ 0,39	2,22 $\pm$ 0,65 **
15,37	1,34 $\pm$ 0,38	4,51 $\pm$ 0,61 **
30,74	3,17 $\pm$ 1,02	11,52 $\pm$ 0,86 **
61,47	9,75 $\pm$ 0,89	25,80 $\pm$ 1,45 **
122,95	22,99 $\pm$ 2,74	51,88 $\pm$ 4,44 **
245,89	40,05 $\pm$ 3,80	73,32 $\pm$ 5,35 **
491,78	66,85 $\pm$ 3,31	87,24 $\pm$ 6,24 **
983,56	87,49 $\pm$ 3,42	97,45 $\pm$ 3,84 **
1967,13	95,65 $\pm$ 2,25	102,37 $\pm$ 4,53 *
3934,26	99,18 $\pm$ 0,89	103,09 $\pm$ 6,80
7868,04	100,0	103,38 $\pm$ 6,75

* Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$

** Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,01$

Tab. 5: Mittelwerte ($\bar{x}$) der relativen Kontraktionshöhen in % mit ihren Standardabweichungen unter Einwirkung von N-L-Phenylalanyl-L-nor-~~ψ~~-ephedrin (16) am Vas deferens der Ratte

Noradrenalin $x \cdot 10^{-8}$ Mol/l	relative Kontraktionshöhe	
	ohne Substanz	mit Substanz 16 $3,35 \times 10^{-6}$ Mol/l
x = 7,68	0,00	$1,14 \pm 0,62$ **
15,37	$0,84 \pm 0,38$	$3,77 \pm 1,41$ **
30,74	$1,94 \pm 0,42$	$12,06 \pm 1,54$ **
61,47	$4,20 \pm 0,33$	$28,36 \pm 1,51$ **
122,95	$12,45 \pm 0,94$	$48,92 \pm 3,59$ **
245,89	$27,65 \pm 3,76$	$79,65 \pm 2,07$ **
491,78	$57,51 \pm 3,24$	$104,94 \pm 2,72$ **
983,56	$79,68 \pm 1,61$	$114,95 \pm 1,90$ **
1967,13	$91,82 \pm 2,40$	$117,20 \pm 1,63$ **
3934,26	100,0	$118,39 \pm 3,27$ **

** Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,01$

Tab. 6: Mittelwerte ($\bar{x}$) der relativen Kontraktionshöhen in % mit ihren Standardabweichungen unter Einwirkung von L-Phenylalanyl-D-ephedrin (17) am Vas deferens der Ratte

Noradrenalin $x \cdot 10^{-8}$ Mol/l	relative Kontraktionshöhe	
	ohne Substanz	mit Substanz 17 $3,35 \times 10^{-5}$ Mol/l
$\bar{x} =$ 7,68	0,05 $\pm$ 0,14	1,04 $\pm$ 0,20 **
15,37	0,49 $\pm$ 0,14	4,32 $\pm$ 0,63 **
30,74	1,89 $\pm$ 0,22	8,93 $\pm$ 0,40 **
61,47	4,29 $\pm$ 0,34	18,19 $\pm$ 0,38 **
122,95	16,79 $\pm$ 0,45	33,96 $\pm$ 1,06 **
245,89	37,08 $\pm$ 1,01	58,34 $\pm$ 1,66 **
491,78	62,03 $\pm$ 1,60	81,44 $\pm$ 2,34 **
983,56	83,86 $\pm$ 0,53	97,20 $\pm$ 2,47 **
1967,13	96,34 $\pm$ 0,76	109,53 $\pm$ 2,42 **
3934,26	100,00	115,95 $\pm$ 2,14 **

** Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,01$

Tab. 7: Mittelwerte ($\bar{x}$) der relativen Kontraktionshöhen in % mit ihren Standardabweichungen unter Einwirkung von N-L-Phenylalanyl-L-ephedrin (18) am Vas deferens der Ratte

Noradrenalin $x \cdot 10^{-8}$ Mol/l	relative Kontraktionshöhe	
	ohne Substanz	mit Substanz 18 $3,35 \times 10^{-5}$ Mol/l
x = 7,68	$0,17 \pm 0,22$	$1,12 \pm 0,31$ **
15,37	$0,51 \pm 0,36$	$2,53 \pm 0,49$ **
30,74	$1,14 \pm 0,52$	$5,09 \pm 0,72$ **
61,47	$2,32 \pm 0,67$	$9,10 \pm 0,99$ **
122,95	$10,55 \pm 0,72$	$23,22 \pm 1,33$ **
245,89	$30,48 \pm 0,72$	$48,21 \pm 1,50$ **
491,78	$54,88 \pm 0,91$	$72,09 \pm 0,62$ **
983,56	$77,77 \pm 1,08$	$91,10 \pm 0,82$ **
1967,13	$95,16 \pm 0,40$	$96,97 \pm 0,91$ **
3934,26	100,0	$101,15 \pm 0,87$ **

** Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,01$

Tab. 8: Potenzierung der NA-Wirkung am Vas deferens der Ratte durch N-L-Phenylalanyl- β -phenylalkylamine

Verbindungs- Nr.	Wirkstoffkonzentration Mol/l	Neg.Log. der EC ₅₀ NA	Neg.log. der EC ₅₀ NA nach Vorbeh. mit Testsubstanz	Abnahme der EC ₅₀ NA in log-Einheiten
11	$3,35 \times 10^{-4}$	-	-	nicht auswertbar
12	$3,35 \times 10^{-4}$	-	-	nicht auswertbar
13	$3,35 \times 10^{-6}$	$5,442 \pm 0,136$	$6,044 \pm 0,126$	0,602
14	$3,35 \times 10^{-5}$	-	-	keine
15	$3,35 \times 10^{-6}$	$5,525 \pm 0,123$	$5,907 \pm 0,200$	0,382
16	$3,35 \times 10^{-6}$	$5,371 \pm 0,112$	$5,948 \pm 0,124$	0,577
17	$3,35 \times 10^{-5}$	$5,462 \pm 0,114$	$5,743 \pm 0,116$	0,281
18	$3,35 \times 10^{-5}$	$5,370 \pm 0,129$	$5,591 \pm 0,111$	0,221
19	$3,35 \times 10^{-5}$	-	-	keine
20	$3,35 \times 10^{-5}$	-	-	keine

* EC₅₀: Noradrenalinkonzentration für halbmaximale Kontraktion am Vas deferens der Ratte

% der maximalen NA-Kontraktion

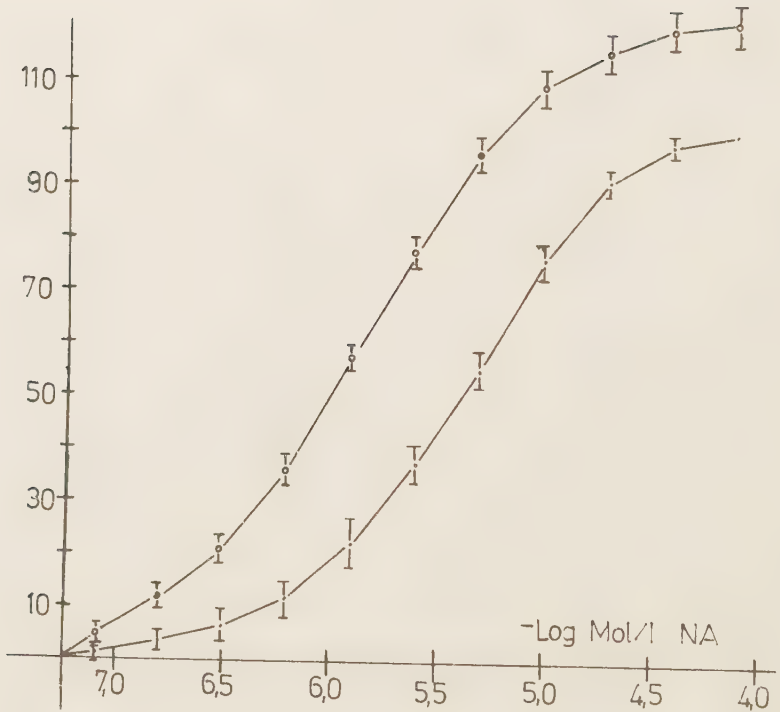


Abb. 1: NA-potenzierende Wirkung von N-L-Phenylalanyl-L-2-amino-1-phenylpropan (13) am Vas deferens der Ratte

● : NA

○ : 13 ($3,35 \times 10^{-6}$ Mol/l)

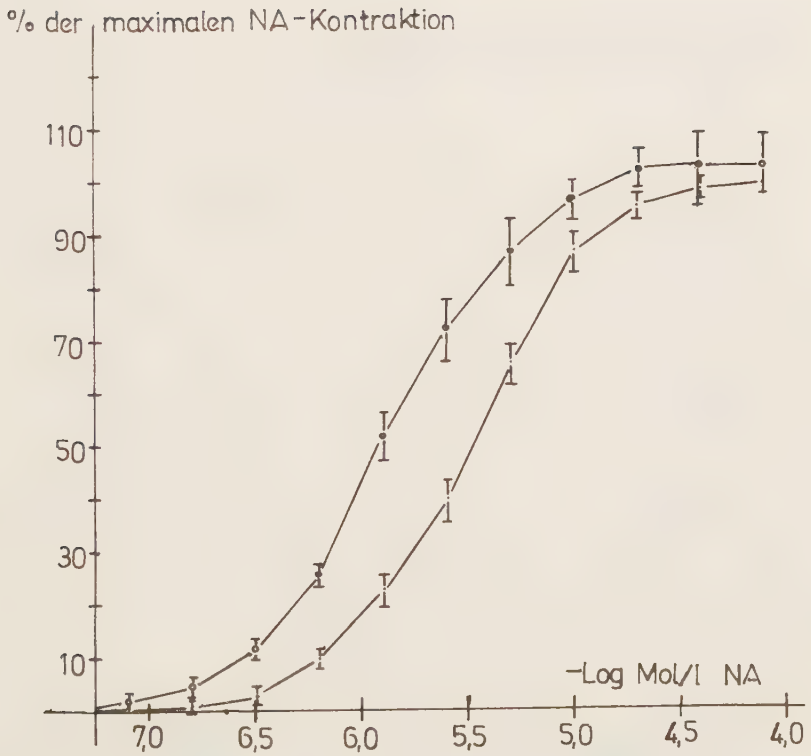


Abb. 2: NA-potenzierten Wirkung von N-L-Phenylalanyl-D-norephedrin (15)
am Vas deferens der Ratte

● —●: NA
○ —○: 15 ($3,35 \times 10^{-6}$ Mol/l)

% der maximalen NA-Kontraktion

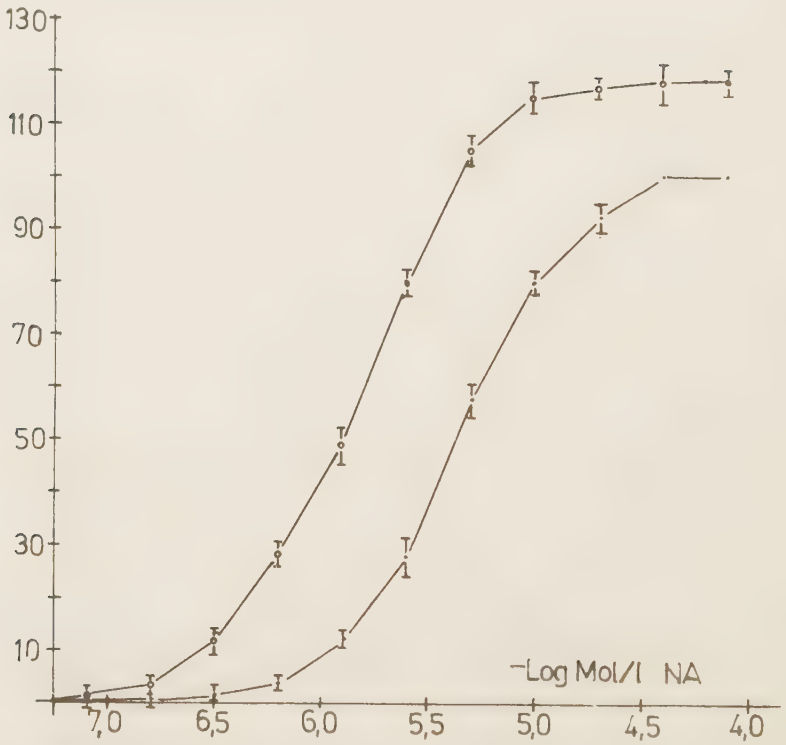


Abb. 3: NA-potenzierende Wirkung von N-L-Phenylalanyl-L-nor-ψ-ephedrin (16) am Vas deferens der Ratte

- — ● : NA
- — ○ : 16 ($3,35 \times 10^{-6}$ Mol/l)

% der maximalen NA-Kontraktion

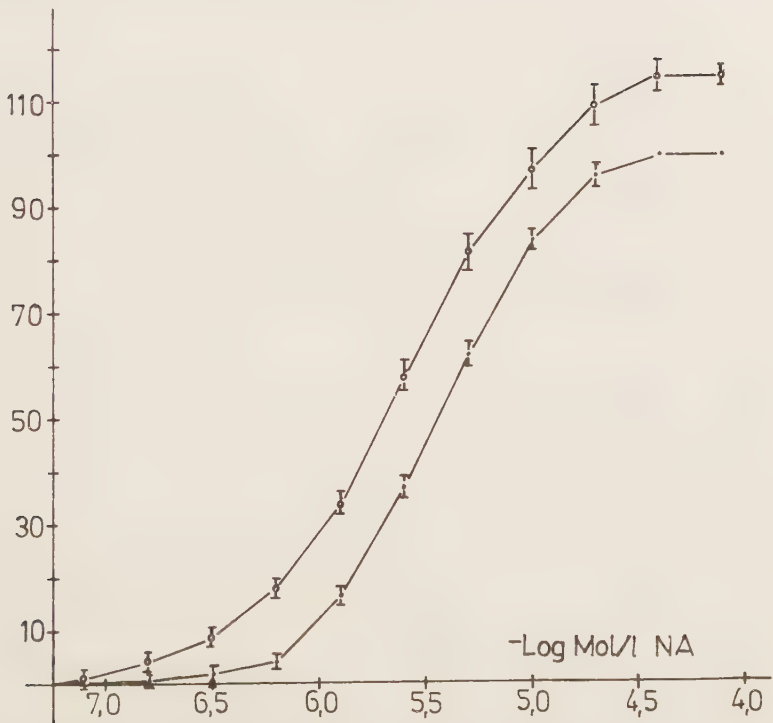


Abb. 4: NA-potenzierende Wirkung von N-L-Phenylalanyl-D-ephedrin (17)
am Vas deferens der Ratte

- — : NA
○ — : 17 ($3,35 \times 10^{-5}$ Mol/l)

% der maximalen NA-Kontraktion

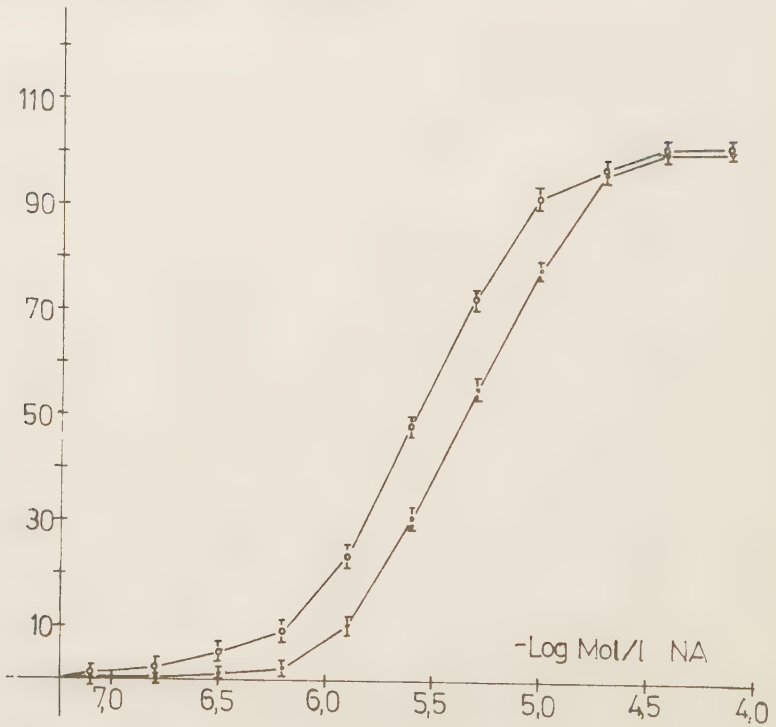


Abb. 5: NA-potenzierende Wirkung von N-L-Phenylalanyl-L-ephedrin (18)
am Vas deferens der Ratte

- — : NA
- — : 18 ($3,35 \times 10^{-5}$ Mol/l)

B/IV Beeinflussung der Hexobarbitalnarkose

Da reversible Ausschaltung spontaner und reflektorischer Aktivität größerer Neuronengruppen im ZNS durch Narkotika wohl kaum durch Blockade eines spezifischen Rezeptors denkbar ist, wird als Ursache eine primär physikalische Veränderung in den Synapsen angenommen. Man vermutet neuerdings, daß sich Narkotika in Membranzustrukturen von Neuronen einlagern und dort über nichtkovalente Bindungen z.B. Van der Waalssche Kräfte in Wechselwirkung mit Proteinen treten.

Über sensorische Bahnen werden Impulse von Sinnesorganen zu entsprechenden Projektionsflächen des Cortex geleitet. Aus Kollateralen der afferenten sensiblen und sensorischen Bahnen erhält das aktivierende retikuläre System (ARS) in der Formatio reticularis Impulse. Aktivität in diesem System hält das Bewußtsein aufrecht und ist durch eine EEG-Arousal Reaktion charakterisiert. Wahrscheinlich bewirkt Verminderung der Erregungsleitung im ARS Bewußtseinsverlust.

Wegen der multisynaptischen Struktur reagiert die Formatio reticularis besonders empfindlich auf Arzneistoffe. Barbiturate reduzieren die Erregbarkeit der ARS für afferente Impulse und unterdrücken dadurch den Weckmechanismus (84). Neuroleptika hemmen die Reizleitung entweder durch Blockade der Rezeptoren für die Transmitter Dopamin, Noradrenalin und Serotonin (55), oder durch Änderung der Speicherfähigkeit spezifischer Grana (z.B. Tetrabenazin).

Zentrale Stimulantien steigern die Erregungsleitung im ARS und üben eine unspezifische Weckwirkung auf die gesamte Großhirnrinde aus (25). Die untersuchten Substanzen 11 - 20 zeigen strukturabhängig unterschiedlichen Einfluß auf die Hexobarbitalnarkose. Die Verbindungen 14, 17, 18 ergaben eine signifikante Schlafzeitverlängerung in allen Dosierungen. Als gemeinsames chemisches Strukturmerkmal haben sie einmal den gleichen Acylrest und außerdem eine Methylgruppe am Säureamidstickstoff. Möglicherweise ist dadurch ein enzymatischer Angriff an der Peptidbindung sterisch behindert, wobei eine Abspaltung der erregend wirkenden Amine unterbleibt. Die Verkürzung der Hexobarbitalnarkose durch Substanz 13

überrascht angesichts seiner Aktivitätssteigerung im Motilitätstest (siehe B/VIII) nicht. Kausal hierfür dürfte wohl die in vivo gefundene Abspaltung der Weckaminkomponente sein (siehe C/VIII). Allerdings bleibt die Schlafzeit unbeeinflusst bei Erniedrigung der Dosis auf 5 mg/kg, ohne daß 13 seine antagonistische Wirkung Reserpin gegenüber verliert (thymoleptische Eigenwirkung von 13?). Verbindung 15 und 16, die ähnliche Strukturmerkmale wie 13 aufweisen, sich jedoch in der Aminkomponente unterscheiden, verkürzen die Hexobarbitalnarkose ebenfalls, jedoch wesentlich schwächer als 13. Möglicherweise besitzen diese Substanzen eine geringere Affinität zu Amid-spaltenden Enzymen.

Die Stoffe 11, 12, 19 und 20 zeigten wie schon beim Versuch am isolierten Vas deferens der Ratte (B/III) keine Wirkung.

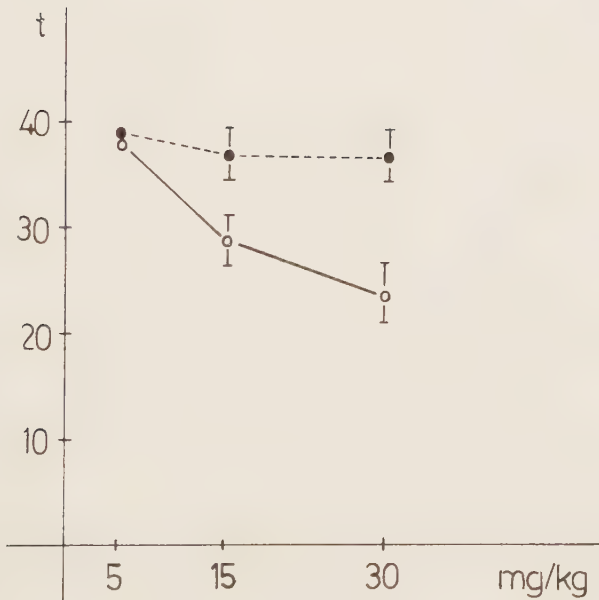


Abb. 6: Beeinflussung der Hexobarbitalnarkose durch Verbindung 13

Abszisse: Dosierung von Substanz 13 in mg/kg

Ordinate: Schlafzeit der Versuchstiere in Minuten (○ ——— ○)

Schlafzeit der Kontrolltiere in Minuten (● - - - - ●)

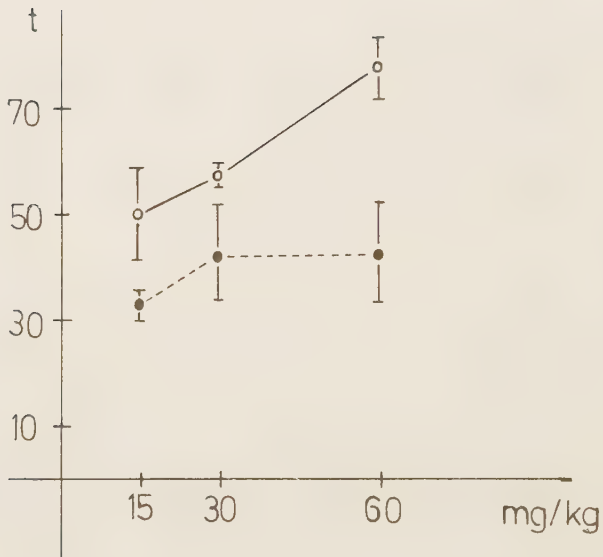


Abb. 7: Beeinflussung der Hexobarbitalnarkose durch Verbindung 17

Abszisse: Dosierung von Substanz 17 in mg/kg

Ordinate: Schlafzeit der Versuchstiere in Minuten (○ — ○)

Schlafzeit der Kontrolltiere in Minuten (● - - - ●)

Tab. 9: Beeinflussung der Hexobarbitalnarkose durch die Substanzen 11 - 20

Hexobarbital - Na 100 mg/kg Maus

Substanz-Nr.	Dosis mg/kg	$\bar{y}$ min.	Vertrauensbereich min.	N_y	$\bar{x}$ min.	Vertrauensbereich min.	N_x	t-Test
11	15,0	41,97	38,06 - 46,27	7	48,71	44,82 - 52,93	7	p 0,05
	30,0	44,37	44,82 - 52,93	7	54,71	46,06 - 65,00	7	-
	60,0	41,55	38,01 - 45,43	7	49,50	45,18 - 54,28	7	p 0,05
12	15,0	50,20	47,23 - 53,36	7	46,48	43,93 - 49,18	7	-
	30,0	45,92	38,36 - 54,97	7	40,96	37,26 - 45,04	7	-
	60,0	47,05	40,18 - 55,11	7	42,04	39,09 - 45,22	7	-
13	5,0	38,85	35,76 - 42,16	7	38,57	35,62 - 41,78	7	-
	15,0	37,08	34,88 - 39,41	7	28,88	26,19 - 31,84	7	p 0,01
	30,0	37,08	34,88 - 39,41	7	24,01	21,40 - 26,94	7	p 0,01
	60,0	-	-	-	-	-	-	-
14	15,0	50,20	47,23 - 53,36	7	55,58	51,68 - 59,77	7	p 0,05
	30,0	38,90	35,81 - 42,20	7	63,10	58,62 - 67,65	7	p 0,01
	60,0	54,49	47,02 - 63,14	7	77,57	69,63 - 86,42	7	p 0,01
15	15,0	37,35	32,17 - 43,36	7	27,95	23,71 - 32,95	7	p 0,05
	30,0	45,54	41,42 - 50,07	7	35,31	32,49 - 38,37	7	p 0,01
	60,0	37,35	32,17 - 43,36	7	17,95	16,69 - 19,76	7	p 0,01

Tab. 9a

Substanz-Nr.	Dosis mg/kg	$\bar{y}$ min.	Vertrauensbereich min.	N_y	$\bar{x}$ min.	Vertrauensbereich min.	N_x	t-Test
16	15,0	37,67	35,98 - 39,45	7	37,93	33,96 - 42,36	7	-
	30,0	45,74	42,09 - 49,70	7	39,99	39,08 - 40,92	7	p 0,01
	60,0	37,67	35,98 - 39,45	7	33,30	28,95 - 38,30	7	-
17	15,0	32,35	28,77 - 36,38	7	49,47	41,45 - 59,03	7	p 0,01
	30,0	42,21	34,05 - 52,32	7	57,82	55,98 - 59,73	7	p 0,01
	60,0	42,21	34,05 - 52,32	7	77,50	71,80 - 83,66	7	p 0,01
18	15,0	34,59	30,24 - 39,55	7	41,75	35,90 - 48,56	7	p 0,05
	30,0	49,42	48,29 - 50,57	7	62,07	50,85 - 75,77	7	p 0,05
	60,0	38,16	35,24 - 41,32	7	68,33	62,88 - 74,25	7	p 0,01
19	15,0	45,36	39,75 - 51,77	7	51,52	47,27 - 56,16	7	-
	30,0	45,36	39,75 - 51,77	7	50,85	43,42 - 59,55	7	-
	60,0	37,44	32,19 - 43,54	7	51,92	44,64 - 60,38	7	p 0,01
20	15,0	44,80	43,05 - 46,62	7	45,85	44,80 - 46,91	7	-
	30,0	45,95	43,88 - 48,12	7	46,98	43,10 - 51,20	7	-
	60,0	36,95	31,35 - 43,55	7	42,40	35,38 - 50,83	7	-

 $\bar{y}$: Mittelwert der Schlafzeiten der Kontrolltiere $\bar{x}$: Mittelwert der Schlafzeiten der Versuchstiere N_y : Anzahl der Kontrolltiere N_x : Anzahl der Versuchstiere

B/V Antagonisierung der Reserpinwirkung

Durch Vorbehandlung mit Desipramin wird bei Ratten die nach Reserpingabe eintretende Sedation in eine kompulsive Hyperaktivität umgekehrt. Diese Beobachtung hat zur Einführung des "Reserpinumkehrtests" (68), als Screening-Verfahren zur Auffindung neuer Antidepressiva geführt. Ein Antagonismus gegenüber Sedativa, die spezifisch die psychoaffektive Sphäre dämpfen wie Reserpin oder Tetrabenazin, liefert einen deutlichen Hinweis auf das Vorliegen antidepressiver Wirkungsqualitäten.

Der genaue Wirkungsmechanismus der "Reserpinumkehr" ist noch nicht bekannt. Es wird vermutet, daß der Effekt durch eine Konzentrationserhöhung der cerebralen Transmitter Noradrenalin, Serotonin und Dopamin bewirkt wird. Reserpin vermindert die Speicherkapazität der neuronalen Vesikel (67,22). Antidepressiva vom Typ des Desipramins hemmen den Rückspeichermechanismus der Transmitter aus dem Extracellulärraum in das Axon (32, 19, 18, 3, 80) und führen so in Kombination mit Reserpin zu einer Konzentrationserhöhung der Neurotransmitter an der subsynaptischen Membran. Dieser Vorgang und die durch Antidepressiva gleichzeitig verursachte Sensibilisierung zentraler adrenerger Effektoren (68, 69) sind im pharmakologischen Test als kompulsive Hyperaktivität registrierbar. Ein Beweis für die Aktivierung adrenerger Mechanismen ist die Hemmung dieser Erregungsvorgänge durch zentrale Sympatholytika wie Dihydroergot^R oder Hydergin^R (48).

In unseren Versuchen verwendeten wir als Kataleptikum Tetrabenazin (50, 57, 85), ein Benzochinolizinderivat mit den gleichen pharmakologischen Wirkungsmerkmalen wie Reserpin, das jedoch eine wesentlich kürzere Wirkungslatenz aufweist und so zu besser reproduzierbaren Werten führt, speziell bei Verbindungen mit kürzerer Wirkdauer.

Schon 10 Minuten nach i.p. Applikation zeigen sich die charakteristischen Symptome wie tiefe Sedation, Muskelrigidität, Ptosis, Lakrimation, Blepharospasmus und Diarrhoe. Vorbehandlung mit 13, 15, 16 führte zur Aufhebung der Katalepsie. Bei Verbindung 13 und 15, die beide die Hexobarbitalnarkose verkürzen, wäre eine enge

Verknüpfung der antikatatonen Wirkung mit den zentral stimulierenden Eigenschaften denkbar, jedoch fehlen die charakteristischen Symptome, wie Hyperreaktivität auf akustische und taktile Reize mit aggressiver Komponente, die nach Applikation von Reserpinantagonisten aus der Amphetaminreihe beschrieben werden (10). Durch Erniedrigung der Dosis konnten ohne Beeinflussung des Katalepsieschutzes die Weckamineigenschaften stark zurückgedrängt werden.

Tab. 10: Einfluß von 11 - 20 auf die kataleptische Wirkung von
Tetrabenazin; Substanz-Gabe i.p., nach 30 Minuten
Applikation von 40 mg/kg Tetrabenazin i.p.,
Versuchstier Maus

Verbindungs- Nr.	Dosierung der Testsubstanzen				
	60 mg/kg	30 mg/kg	15 mg/kg	10 mg/kg	5 mg/kg
11	+	+	+	+	+
12	+	+	+	+	+
13	-	-	-	-	-
14	+	+	+	+	+
15	-	-	-	+	+
16	-	-	-	+	+
17	+	+	+	+	+
18	+	+	+	+	+
19	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+

-: Aufhebung der Tetrabenazinkatalepsie

+: Keine Beeinflussung der Tetrabenazinkatalepsie

B/VI Oxotremorinantagonismus

Der Morbus Parkinson ist gekennzeichnet durch ein extrapyramidales Syndrom, zusammengesetzt aus Akinesie, Rigor und Tremor. Als Ursache wird eine Gleichgewichtsverstellung im Steuermechanismus striärer Neurone angenommen. Striäre Neurone stehen unter dem erregenden Einfluß von Acetylcholin, der durch die dämpfende Wirkung dopaminerger Neurone stabilisiert ist. Oxotremorin erhöht wahrscheinlich durch Aktivierung der Acetylcholinacetylase die cholinerge Erregung des Striatums, was eine Erhöhung der Spinalmotorik zur Folge hat (72). Zentrale Anticholinergika heben den Tremor auf. Die Befunde von Bogdanski (12) et al., daß der Imipraminantagonismus bestimmten Reserpinwirkungen gegenüber zentralcholinergen Ursprungs sei, und die Erfolge bei Behandlung des Morbus Parkinson mit Imipramin (73, 46, 47, 79), führten zu der Anschauung, zentral-anticholinerge Effekte seien maßgeblich an der Wirkung der Thymoleptika beteiligt. Pohlmeier und Matussek (56) verneinen jedoch auf Grund klinischer Erfahrungen mit Desipramin diese Theorie und machen für die Antiparkinsonwirkung des Imipramins vielmehr eine adrenerge Beeinflussung dopaminerger Rezeptoren im ZNS verantwortlich. Die Erkenntnis, daß Oxotremorin, ein Metabolit des Tremorins, die Wirksubstanz darstellt und daß verschiedene Pharmaka wie z.B. Desipramin und Nortriptylin durch Blockierung der metabolischen Bildung von Oxotremorin zentral-anticholinerge Eigenschaften vortäuschen (70, 42), läßt die meisten Resultate, die mit Tremorin als Testpharmakon erzielt wurden, fragwürdig erscheinen (42). Daraus resultieren wohl auch die recht unterschiedlichen Literaturergebnisse mit diesem Testmodell.

Von den von uns untersuchten Substanzen konnte nur Verbindung 13 den Oxotremorin-Tremor signifikant antagonisieren. 13 ergab im weiteren Screening auch periphere cholinolytische Eigenschaften, jedoch erst in etwa 10-fach höherer Dosierung als 14, das im Oxotremorin-Test unwirksam war. Wenn auch Ergebnisse im peripheren Bereich nicht immer auf das ZNS übertragbar sind, nehmen wir doch an, daß der Antagonismus gegen Oxotremorin nicht auf eine anticholinerge Wirkung, sondern vielmehr auf zentrale sympathomimetische Beeinflussung dopaminerger Rezeptoren oder Hemmung des

Dopamin-"re-uptakes" zurückzuführen ist und schließen uns damit der Theorie von Coyle und Snyder (17) an, die die Antiparkinson-wirkung verschiedener Anticholinergika wie z.B. des Benztropin mit der "Re-uptake"-hemmung des Dopamins in Verbindung bringen. Diese Theorie wurde auch von Hunt (38) bei der Testung von Nomifensine an isolierten striären Synaptosomen bestätigt.

Die Verbindungen 15 - 18, die am Vas deferens eine NA-verstärkende Wirkung zeigten, aber bei der Prüfung auf zentrale adrenotrope Eigenschaften im Reserpinumkehrtest unwirksam oder im Vergleich zu 13 deutlich weniger wirksam waren, besaßen im Oxotremorintest keine Wirkung.

Tab. 11: Beeinflussung des Oxotremorin-Tremors durch

N-L-Phenylalanyl- β -phenylalkylamine.

Applikation der Substanz: i.p. gelöst in isotonischer

Glucose-Lösung; nach 30 min. 208 μ g/kg Oxotremorin i.v.

Substanz Nr.	Dosis mg/kg	Tremor* Mittelwert	Stichproben umfang	p**
13	30,0	0,7	10	< 0,01
14	30,0	2,0	10	> 0,05
15	30,0	1,6	10	> 0,05
16	30,0	1,8	10	> 0,05
17	30,0	2,0	10	> 0,05
18	30,0	1,4	10	< 0,05
Akineton ^R	25,0	0,2	10	< 0,01

* Tremorskala: 10 min. Dauertremor = 2;
unterbrochener Tremor = 1;
schwacher Tremor = 0,5;

** Die Berechnung erfolgt durch den statistischen Vergleich prozentualer Häufigkeiten mit Hilfe von m x n - Tafeln und χ^2 . Als Vergleich dient der Kontrollversuch ohne Antagonisten (N = 10; 100%)

B/VII Beeinflussung des Kampftriebes männlicher isolierter Mäuse

Die Beeinflussung der Aggressivität kann zur Prüfung psychotroper Substanzen herangezogen werden. Zentral wirksame Anticholinergica hemmen die Aggressivität bzw. den Kampftrieb isolierter männlicher Mäuse (39, 88). Charakteristisch ist dabei, daß die Tiere nicht sediert sind. Sie beschnuppern und verfolgen den Eindringling, aber sie beißen ihn nicht mehr. Die fehlende Aggressivität im Verhalten des isolierten Tieres ist offensichtlich auch dem Eindringling bewußt, denn er richtet sich nicht ängstlich auf, sondern exploriert den Käfig oder setzt sich hin und putzt sich (62).

Bei der Untersuchung unserer Substanzen konnten wir feststellen, daß Verbindung 13 gleiches Verhalten verursachte wie beschrieben, mit dem einen Unterschied, daß das isolierte Tier jeden Kontakt mit dem Eindringling vermied.

14, 17, 18 wirkten ebenfalls hemmend, allerdings fielen die Tiere nach Applikation der Substanzen in tiefe Sedation. Die schon bei der Hexobarbitalnarkose festgestellte neuroleptische Wirkungskomponente scheint dafür verantwortlich zu sein.

15 und 16 erzeugten im Gegensatz dazu gesteigerten Kampftrieb und vermehrte Aggression bei den isolierten Tieren.

Bemerkenswert bei diesem Versuch ist die gegensätzliche Wirkung von 15 und 16 im Vergleich zu 13. Alle 3 Verbindungen verstärkten in etwa gleichen Konzentrationen die Noradrenalin Kontraktion am isolierten Vas deferens der Ratte und verkürzten die Hexobarbitalnarkose bei der Maus - 15 und 16 allerdings deutlich schwächer als 13 - wofür zentral-stimulierende Effekte verantwortlich gemacht werden. Offensichtlich scheint ihr Wirkungsmechanismus auf zentraler Ebene zu differieren.

Tab. 12: Beeinflussung des Kampftriebes isolierter männlicher Mäuse
durch N-L-Phenylalanyl- β -phenylalkylamine

Substanz Nr.	Dosis mg/kg	Kampftrieb		
		gehemmt	normal	gesteigert
13	30,00	6	1	-
14	30,00	7	-	-
15	30,00	-	-	7
16	30,00	-	-	7
17	30,00	7	-	-
18	30,00	7	-	-

B/VIII Beeinflussung der Spontanmotilität

Von den untersuchten Stoffen besitzt Verbindung 13 in einer Dosierung von 30 mg/kg vom Spontanverhalten her eine deutlich erkennbare zentralerregende Komponente, die jedoch bei Erniedrigung der Dosis auf 5 mg/kg verlorenght. Die motorische Exzitation ist frei von dysphorischen Lautäußerungen und nur teilweise auf gesteigerte lokomotorische Bewegungen zurückzuführen. Hauptsächlich werden Stereotypreaktionen wie Suchbewegungen des Kopfes, Schnüffeln und Manegegang, Symptome also, die zentrale Anticholinergica vom Typ des Biperidens sowie Psychostimulantien aus der Amphetaminreihe aufweisen, beobachtet. Ob es sich hier um eine anticholinerg bedingte Steigerung der lokomotorischen Aktivität handelt, oder ob psychotomimetische Wirkungsqualitäten dafür verantwortlich zu machen sind, konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden. Eine Abklärung dieser Frage wäre allenfalls durch elektroencephalographische Messungen der Afferenzfelder während der Versuchsphase möglich. Dort zeigen Anticholinergica im Gegensatz zur Tonisierung von Psychotomimetika deutliche Desaktivierung.

Substanz 14 zeigte trotz signifikanter Verlängerung der Hexobarbitalnarkose keine Verminderung der Spontanmotilität. Untersuchungen, bei denen zu Beginn der 1-stündigen Adaptionsphase 14 appliziert wurde, zeigten jedoch eine deutliche Aktivitätsminderung im Vergleich zu Normaltieren. Es scheint deshalb vorstellbar, daß angeborene Instinktabläufe z.B. Exploration einer unbekannten Umgebung, unter dem Einfluß von 14 stark vermindert sind. Dieser Eingriff in das Verhalten von Tieren läßt sich auf ganz verschiedenen pharmakodynamischen Wegen hervorrufen. Sowohl Stoffe mit zentral-anticholinergischer Wirkung als auch stark sympathicomimetische Verbindungen wie z.B. LSD, aber auch Substanzen, die weder ausgeprägte sympathicomimetische noch anticholinerge Eigenschaften besitzen, wie Phencyclidin (33), führen zu Eingriffen in das Instinkverhalten von Tieren. Substanz 14 ist anhand dieses Ergebnisses nicht eindeutig einzuordnen, läßt aber einen zentralen Wirkungsmechanismus ziemlich sicher erscheinen.

Substanz 3, appliziert in der in 13 latent vorhandenen Konzentration, zeigt die ersten zwei Stunden die höchste Aktivitätssteige-

rung. Im Zeitraum von 2 - 4 Std. post appl. tritt jedoch signifikante Wirkungsminderung im Vergleich zu 13 ein, was eine deutlich verkürzte Inaktivierungszeit im Vergleich zu 13 annehmen läßt.

Tab. 13: Beeinflussung der Spontanmotilität durch die N-L-Phenylalanyl- β -phenylalkylamine 13 und 14

Substanz Nr.	Dosis mg/kg	Adaptionsphase Ausgangsquotient $\frac{\text{Versuch}}{\text{Kontrolle}}$	Wachphase Versuchsquotient $\frac{\text{Versuch}}{\text{Kontrolle}}$	Ruhephase Versuchsquotient $\frac{\text{Versuch}^*}{\text{Kontrolle}}$
13	5,00	1,05	-	1,45
13	30,00	0,95	-	3,80
14	30,00	0,93	1,06	-
14**	30,00	0,36	-	-

* Die Ergebnisse stellen den Mittelwert aus 3 Versuchen dar.

** Substanz wurde bereits vor der Adaptionsphase appliziert.

Tab. 14: Wirkungsvergleich von Verbindung 3 und 13 während der Ruhephase in Abhängigkeit von der Verweildauer im Organismus

Substanz Nr.	Versuchsquotient*: $\frac{\text{Versuch}}{\text{Kontrolle}}$						
	0,25 Std.	0,50 Std.	1,00 Std.	1,50 Std.	2,0 Std.	3,0 Std.	4,0 Std.
3	1,40	1,60	5,9	4,4	2,5	1,3	1,3
13	2,00	2,80	2,9	2,6	2,7	2,6	2,4

* Mittelwert aus 3 Versuchen

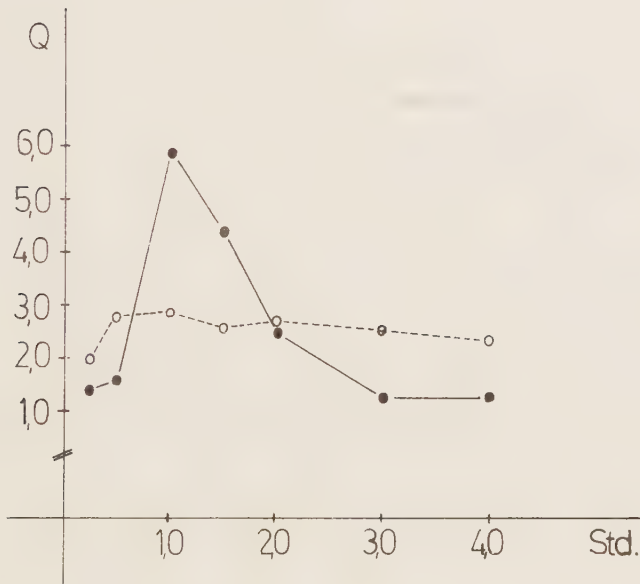


Abb. 8: Einfluß von 3 und 13 auf die Spontanmotilität der Maus in Abhängigkeit von der Verweildauer im Organismus.

3 = ● — ●
 13 = ○ - - - ○
 Q = Versuchsquotient

B/IX Hemmung der Monaminoxidase in vitro

Die im Gewebe gespeicherten Monamine werden zum großen Teil durch Monaminoxidase (MAO) abgebaut (54). Bei Hemmung dieses Enzyms vivo kommt es zu einer Vermehrung endogener Amine wie 5-Hydroxytryptamin, Dopamin und Noradrenalin und damit in direktem Zusammenhang durch Erhöhung der Transmitterkonzentration zu einer Stimulierung des ZNS. Dies führt insbesondere bei gehemmten Depressionen zu einer Hebung der Stimmungslage und Steigerung der psychomotorischen Aktivität. Klassischer Vertreter dieser Arzneistoffgruppe ist das Hydrazinderivat Iproniazid. Unter den zahlreichen Hydrazin-Derivaten zeigen jedoch nur solche einen antidepressiven Effekt, die MAO in vivo stark hemmen. Das dem Iproniazid ($PI_{50} = 4,46 \times 10^{-5}$) chemisch verwandte Isoniazid, das MAO nur schwach hemmt, hat keine wesentliche Wirkung bei Depressionen (54).

In der Literatur beschriebene antikonvulsive (53) Eigenschaften, Verkürzung der Barbiturat-Narkose (36), gesteigerte Motilität sowie motorische Erregbarkeit (10) waren bei den von uns getesteten Substanzen zumindest bei 14 nicht feststellbar. Nachdem 13 eine nichtkompetitive Hemmung der MAO in etwa dem gleichen Konzentrationsbereich zeigt wie 14, dürfte diese Eigenschaft zumindest nicht ursächlich für die zentralstimulierende Wirkung von 13 sein.

Tab. 15: Hemmung der Monaminoxidase

Mittelwerte ($n = 3$) der reziproken Reaktionsgeschwindigkeiten ausgedrückt durch die Extinktionsunterschiede/Minute (ΔE /Min.) bei 253 nm unter Variation der Substratkonzentration und Zusatz von Hemmstoff 13

Substrat: m-Jod-benzylamin

Enzym: solubilisierete MAO aus Rattenleber

Proteingehalt nach Lowry (44): 18 mg/ml

Inhibitor: $2,83 \times 10^{-3}$ Mol/l N-L-Phenylalanyl-L-2-amino-1-phenyl-propan (13)

$1/S \times 10^{-3}$ Mol/l	ohne Hemmstoff		mit Inhibitor 13 $2,83 \times 10^{-3}$ Mol/l	
	$\Delta E/\text{Min.}$	$\frac{1}{v}$	$\Delta E/\text{Min.}$	$\frac{1}{v}$
4,00	0,067	14,85	0,018	56,63
6,00	0,057	17,44	0,015	66,66
12,00	0,052	19,11	0,012	81,10
15,02	0,040	25,00	0,010	96,80
30,03	0,031	32,62	0,007	130,55
60,24	0,0166	60,02	0,005	214,60

Tab. 16: Hemmung der Monaminoxidase

Mittelwert ($n = 3$) der reziproken Reaktionsgeschwindigkeiten
ausgedrückt durch die Extinktionsunterschiede/Minute ($\Delta E/\text{Min.}$)
bei 253 nm unter Variation der Substratkonzentration und

Zusatz von Hemmstoff 14

Substrat: m-Jod-benzylamin

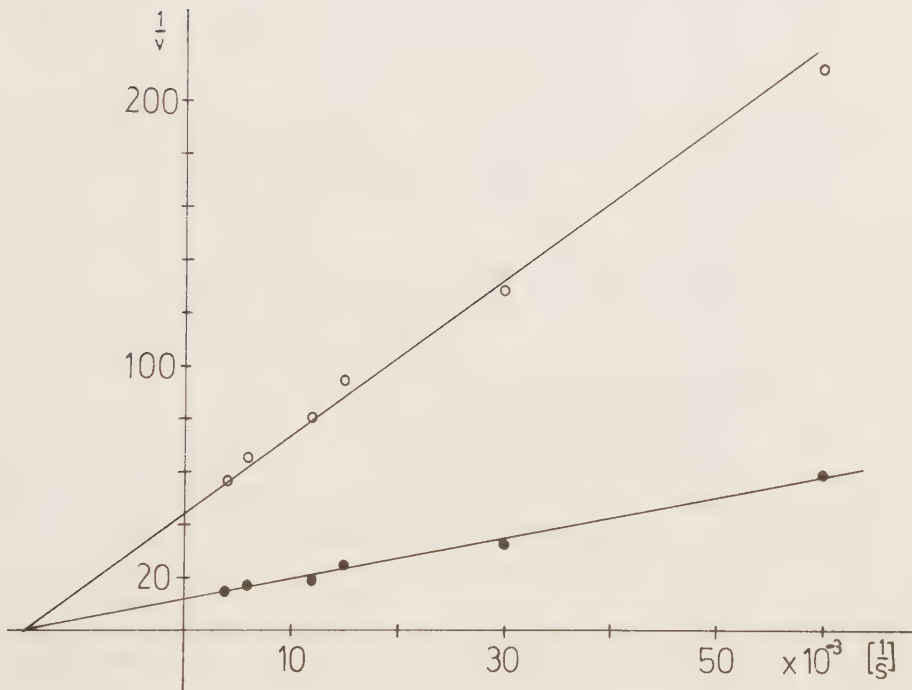
Enzym: solubilisierte MAO aus Rattenleber

Proteingehalt nach Lowry (44): 18 mg/ml

Inhibitor: $2,70 \times 10^{-3}$ Mol/l N-L-Phenylalanyl-L-2-methylamino-1-phenylpropan (14)

$1/S \times 10^{-3}$ Mol/l	ohne Hemmstoff		mit Inhibitor 14 $2,70 \times 10^{-3}$ Mol/l	
	$\Delta E/\text{Min.}$	$\frac{1}{v}$	$\Delta E/\text{Min.}$	$\frac{1}{v}$
4,00	0,048	21,28	0,020	50,76
6,00	0,045	22,00	0,017	60,00
12,00	0,039	25,43	0,013	76,92
15,02	0,034	29,41	0,012	85,47
30,03	0,031	32,26	0,009	111,11
60,24	0,020	50,00	0,005	200,00

Abb. 9: Nichtkompetitive Hemmung der Monaminoxidase durch
 N-L-Phenyl-alanyl-L-2-amino-1-phenylpropan (13)
 Lineweaver-Burk Diagramm (43)
 Substrat: m-Jod-benzylamin
 Präinkubationszeit: 3 Minuten



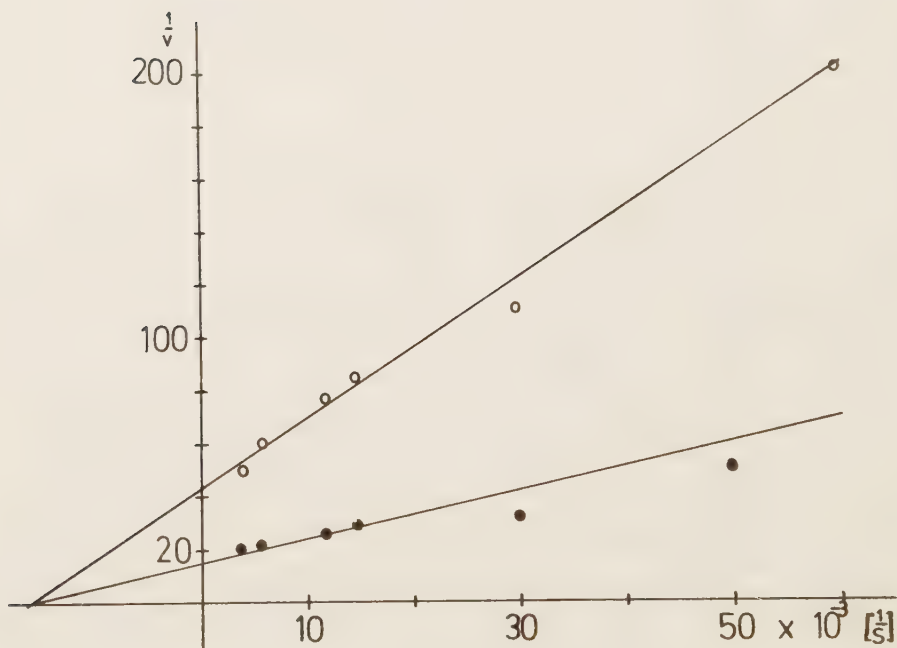
Abszisse: reziproker Wert der Substratkonzentration $1/S$

Ordinate: reziproker Wert der Reaktionsgeschwindigkeit ausgedrückt durch die Extinktionszunahme/Minute bei 253 nm $1/v$

(○) $2,83 \times 10^{-3}$ Mol/l Inhibitor 13

(●) ohne Inhibitor

Abb. 10: Nichtkompetitive Hemmung der Monaminoxidase durch
 N-L-Phenyl-alanyl-L-2-methylamino-1-phenylpropan (14)
 Lineweaver-Burk Diagramm (43)
 Substrat: m-Jod-benzylamin
 Präinkubationszeit: 3 Minuten



Abszisse: reziproker Wert der Substratkonzentration $1/S$

Ordinate: reziproker Wert der Reaktionsgeschwindigkeit ausgedrückt durch die Extinktionszunahme/Minute bei 253 nm $1/v$

(○) $2,70 \times 10^{-3}$ Mol/l Inhibitor 14

(●) ohne Inhibitor

B/X Spasmolyse am isolierten Jejunum der Ratte

Die untersuchten N-Aminoacyl- β -phenylalkylamine 13 und 14 zeigen am isolierten Jejunum der Ratte cholinolytische Eigenschaften, die mit steigender Inhibitorkonzentration verstärkt werden und durch Erhöhung der Acetylcholinkonzentration nicht aufgehoben werden könne. Demnach ist ein kompetitiver Hemmechanismus am Rezeptor auszuschließen und eine unspezifische, papaverinartige muskulotrop-spasmolytische Wirkung anzunehmen.

Lokalanästhetika, wie Procain, setzen ebenfalls die Kontraktionsfähigkeit der glatten Muskulatur herab. Diese Wirkung beruht auf einer Hemmung des passiven Ionentransports in der Zellmembran während der Erregung (64).

Der leitungshemmende Einfluß der Verbindungen 13 und 14, festgestellt am isolierten Ventrikelstreifen des Froschherzens, läßt folgenden Mechanismus vermuten:

Im Ruhezustand ist die Membranstruktur durch Bindung von Calcium-Ionen an ihrer Außenseite stabilisiert. Beim Einsetzen der Depolarisation verbinden sich Na^+ -Ionen unter Verdrängung von Ca^{++} -Ionen mit dem Carrier (23). Die Bindung der Na^+ -Ionen ist von einer Konformationsänderung des Proteins begleitet (86). Der Ionentransport durch die Lipidphase der Membran wird durch die nach außen gerichteten hydrophoben Seitenketten des Carriers ermöglicht.

Erregungshemmende Substanzen verdrängen im Ruhezustand Ca^{++} -Ionen von ihrem Bindungsort am Carrier und werden je nach Affinität mehr oder weniger fest an der hydrophoben Außenseite des Carrierproteins gebunden, was eine Stabilisierung seiner Konformation bedingt. Die Anlagerung der Na^+ -Ionen im Innern des Carriers wird dadurch verhindert und die Erregbarkeit der Membran herabgesetzt (11,26).

Die Muskelkontraktion resultiert aus einer Komplexbildung von Aktin, Myosin und ATP, wobei ATP gespalten und die Brücken zwischen Myosin und Aktin verkürzt werden. Dieser Vorgang ist nur bei entsprechend hoher Ca-Konzentration möglich (10^{-5} Mol/l).

Durch Variation hydrophober Gruppen lassen sich demnach lokal-anaesthetische und spasmolytische Wirkungsqualitäten in der Reihe der N-Aminoacylphenylalkyl- bzw. alkanolamine modulieren. Die bei Stereoisomeren beobachteten Wirkungsunterschiede bezüglich ihrer lokalanaesthetischen Eigenschaften innerhalb dieser Substanzklasse überschreiten nicht den Faktor 2 - 3 (65).

Im Vergleich zur spasmolytischen Wirkung des Papaverins ($ID_{50} = 1,1 \times 10^{-5}$) am Jejunum der Ratte besitzt 14 eine deutliche Überlegenheit, während 13 dem Papaverin etwa gleichwertig ist.

Auch bei zahlreichen Thymoleptika und Neuroleptika wird von anticholinergen Eigenschaften berichtet (21, 31). Die thymoleptische Wirkung von Imipramin wird auf seine anticholinergen Eigenschaften zurückgeführt (7, 15).

Tab. 17: Mittelwerte ($\bar{x}$) der relativen Kontraktionshöhen in % mit ihren Standardabweichungen unter Einwirkung von Substanz 13

* p 0,05
** p 0,01

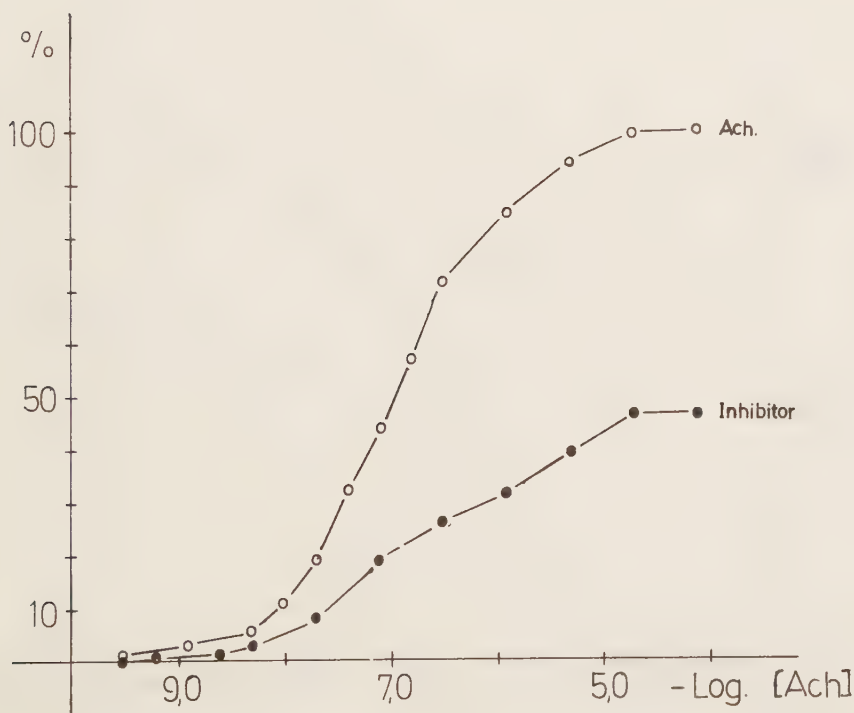
-log [Act] Mol/l	relative Kontraktionshöhe					
	ohne Hemmstoff	Inhibitor ₅ 4,25 x 10 ⁻⁵ Mol/l	ohne Hemmstoff	Inhibitor ₅ 2,125 x 10 ⁻⁵ Mol/l	ohne Hemmstoff	Inhibitor ₅ 1,06 x 10 ⁻⁵ Mol/l
9,505	0,72 $\pm$ 0,27	0,12 $\pm$ 0,31**	1,37 $\pm$ 0,55	0,45 $\pm$ 0,70*	0,58 $\pm$ 0,76	0,11 $\pm$ 0,17
9,204	1,58 $\pm$ 0,54	0,23 $\pm$ 0,61**	2,75 $\pm$ 0,73	0,89 $\pm$ 1,37**	1,42 $\pm$ 1,37	0,28 $\pm$ 0,49
8,903	2,78 $\pm$ 0,89	1,16 $\pm$ 1,06**	4,76 $\pm$ 1,30	1,79 $\pm$ 1,91**	2,34 $\pm$ 1,94	0,53 $\pm$ 0,79
8,602	3,96 $\pm$ 1,19	2,22 $\pm$ 0,96*	8,73 $\pm$ 3,16	3,19 $\pm$ 2,15**	3,87 $\pm$ 2,53	1,28 $\pm$ 1,05*
8,301	5,54 $\pm$ 1,60	3,53 $\pm$ 1,03*	13,90 $\pm$ 5,01	4,79 $\pm$ 2,91**	5,57 $\pm$ 3,24	2,21 $\pm$ 1,15*
8,000	10,79 $\pm$ 0,49	5,09 $\pm$ 0,91**	20,53 $\pm$ 5,66	7,93 $\pm$ 3,95**	8,03 $\pm$ 3,48	3,42 $\pm$ 1,61*
7,699	18,90 $\pm$ 1,29	8,18 $\pm$ 2,04**	29,64 $\pm$ 6,52	14,00 $\pm$ 6,21**	13,68 $\pm$ 4,76	6,49 $\pm$ 2,31**
7,398	32,44 $\pm$ 2,48	13,43 $\pm$ 2,16**	41,90 $\pm$ 6,53	21,86 $\pm$ 6,34**	23,30 $\pm$ 6,92	13,40 $\pm$ 4,47*
7,097	44,62 $\pm$ 2,25	18,84 $\pm$ 3,00**	52,61 $\pm$ 5,83	30,68 $\pm$ 5,42**	36,05 $\pm$ 7,57	24,61 $\pm$ 7,75*
6,796	57,96 $\pm$ 1,25	23,12 $\pm$ 2,79**	62,30 $\pm$ 5,10	38,58 $\pm$ 6,40**	49,16 $\pm$ 7,08	37,32 $\pm$ 7,49*
6,495	71,57 $\pm$ 2,01	25,62 $\pm$ 3,10**	70,94 $\pm$ 3,77	44,02 $\pm$ 7,69**	58,76 $\pm$ 8,25	48,67 $\pm$ 6,36*
6,194	78,57 $\pm$ 1,34	28,23 $\pm$ 3,51**	78,93 $\pm$ 3,73	50,08 $\pm$ 8,80**	68,63 $\pm$ 7,36	60,22 $\pm$ 5,78
5,893	84,64 $\pm$ 1,02	31,50 $\pm$ 3,47**	85,33 $\pm$ 2,75	55,42 $\pm$ 9,98**	76,58 $\pm$ 6,87	70,43 $\pm$ 5,46
5,592	90,47 $\pm$ 0,48	35,95 $\pm$ 3,80**	89,84 $\pm$ 1,93	59,89 $\pm$ 9,25**	83,40 $\pm$ 6,49	77,66 $\pm$ 5,08
5,291	94,15 $\pm$ 0,68	39,68 $\pm$ 3,41**	93,26 $\pm$ 1,47	63,19 $\pm$ 9,64**	89,43 $\pm$ 5,51	83,90 $\pm$ 4,70
4,990	97,32 $\pm$ 0,35	43,77 $\pm$ 3,05**	96,61 $\pm$ 0,67	65,80 $\pm$ 9,94**	93,93 $\pm$ 3,97	88,68 $\pm$ 4,03*
4,689	99,23 $\pm$ 0,29	46,65 $\pm$ 2,88**	98,62 $\pm$ 0,57	67,68 $\pm$ 9,25**	97,62 $\pm$ 1,81	92,59 $\pm$ 3,67*
4,388	100,0	46,89 $\pm$ 2,96**	100,0	68,64 $\pm$ 8,79**	99,71 $\pm$ 0,37	94,55 $\pm$ 3,03**
4,087	100,0	46,89 $\pm$ 2,96**	100,0	68,64 $\pm$ 8,79**	100,0	94,78 $\pm$ 2,97**

Tab. 18: Mittelwerte ($\bar{x}$) der relativen Kontraktionshöhen in % mit ihren Standardabweichungen unter Einwirkung von Substanz 14

* p 0,05
** p 0,01

-log [Act] Mol/l	relative Kontraktionshöhe					
	ohne Hemmstoff	Inhibitor- 6 $8,108 \times 10^{-6}$ Mol/l	ohne Hemmstoff	Inhibitor-6 $4,054 \times 10^{-6}$ Mol/l	ohne Hemmstoff	Inhibitor-6 $1,014 \times 10^{-6}$ Mol/l
9,505	0,86±0,78	0*	0	0	0	0
9,204	1,91±1,76	0*	0	0	0	0
8,903	3,10±2,43	0**	0	0	0	0
8,602	4,05±2,66					
8,301	6,00±3,40	0,09±0,16**	0,66±0,49	0,03±0,08*	0,43±0,25	0,24±0,25
8,000	9,09±4,26	0,46±0,41**	1,86±0,84	0,47±0,41**	1,94±0,47	1,17±0,38**
7,699	14,93±5,69	0,91±0,70**	5,89±3,51	1,27±0,45**	5,56±1,85	2,64±0,56**
7,398	24,66±6,83	1,55±0,80**	14,95±4,91	4,59±1,10**	15,57±3,50	9,78±1,11**
7,097	38,85±5,96	2,83±0,83**	34,66±9,90	12,38±1,12**	34,63±4,04	24,39±5,80**
6,796	49,49±9,78	4,80±1,51**	55,78±9,20	22,11±3,92**	57,05±2,66	42,58±5,32**
6,495	60,11±9,51	8,73±3,17**	71,29±9,36	32,78±2,23**	74,22±2,71	57,28±1,68**
6,194	70,28±9,68	14,20±4,59**	80,55±6,16	42,54±3,85**	82,01±2,64	67,69±1,71**
5,893	78,27±7,57	20,28±5,41**	88,22±3,24	47,45±4,17**	88,06±2,00	74,78±2,14**
5,592	84,99±6,03	26,11±6,09**	92,32±2,27	50,93±3,83**	92,80±1,48	79,37±2,74**
5,291	91,05±4,32	32,00±6,63**	95,92±1,07	53,90±3,66**	96,01±1,15	83,01±3,14**
4,990	95,22±3,18	36,11±5,69**	97,82±1,00	55,83±3,80**	98,10±1,05	85,94±3,20**
4,689	98,25±1,71	39,42±4,42**	99,13±0,49	57,43±3,93**	99,59±0,54	88,26±2,99**
4,388	99,67±0,62	41,40±3,69**	99,94±0,14	59,21±3,73**	100,0	88,98±2,55**
4,087	100,0	41,67±3,66**	100,0	59,85±3,93**	100,0	89,45±2,63**
		41,72±3,68**	100,0	59,85±3,93**	100,0	89,45±2,63**

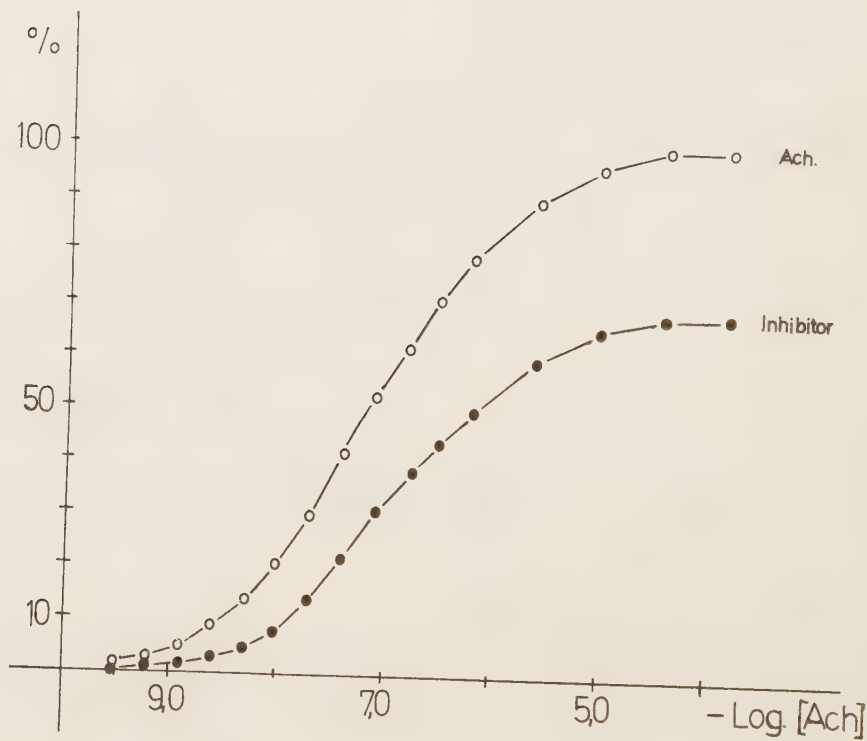
Abb. 11: Beziehung zwischen Konzentration und Wirkung von Acetylcholin am isolierten Jejunum der Ratte bei Anwesenheit von Hemmstoff 13 ($4,25 \times 10^{-5}$ Mol/l)
 ACH = unbeeinflusste Dosis-Wirkungsbeziehung



Abszisse: neg. Log. der molaren Acetylcholin-Konzentration

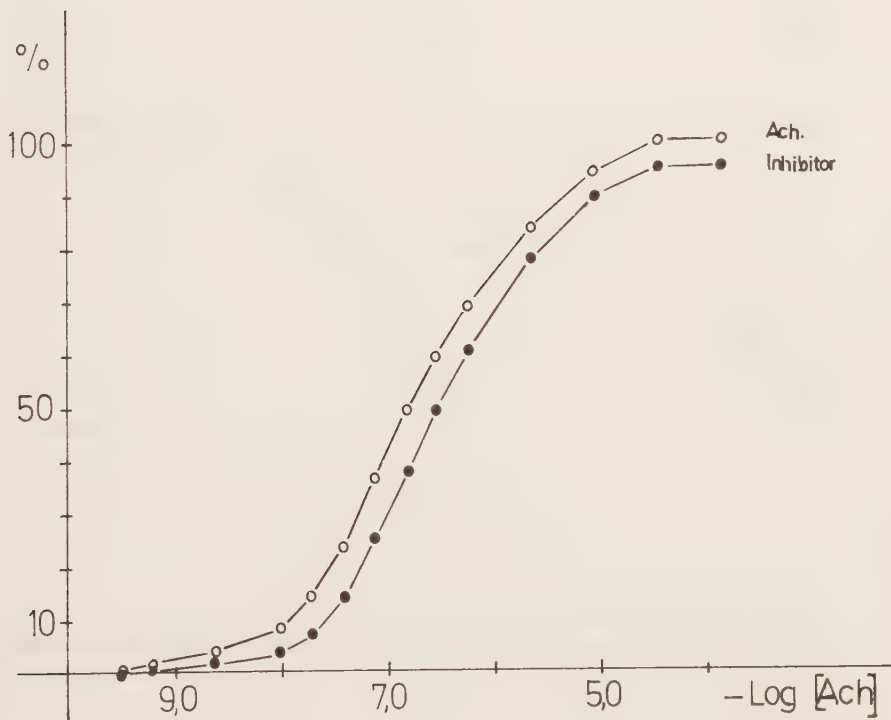
Ordinate: Kontraktionshöhe relativ zu der durch Acetylcholin erreichten Maximalkontraktion in %.

Abb. 12: Beziehung zwischen Konzentration und Wirkung von Acetylcholin am isolierten Jejunum der Ratte bei Anwesenheit von Hemmstoff 13 ($2,125 \times 10^{-5}$ Mol/l)
 ACH = unbeeinflusste Dosis-Wirkungsbeziehung



Abszisse: neg. Log. der molaren Acetylcholin-Konzentration
 Ordinate: Kontraktionshöhe relativ zu der durch Acetylcholin
 erreichten Maximalkontraktion in %.

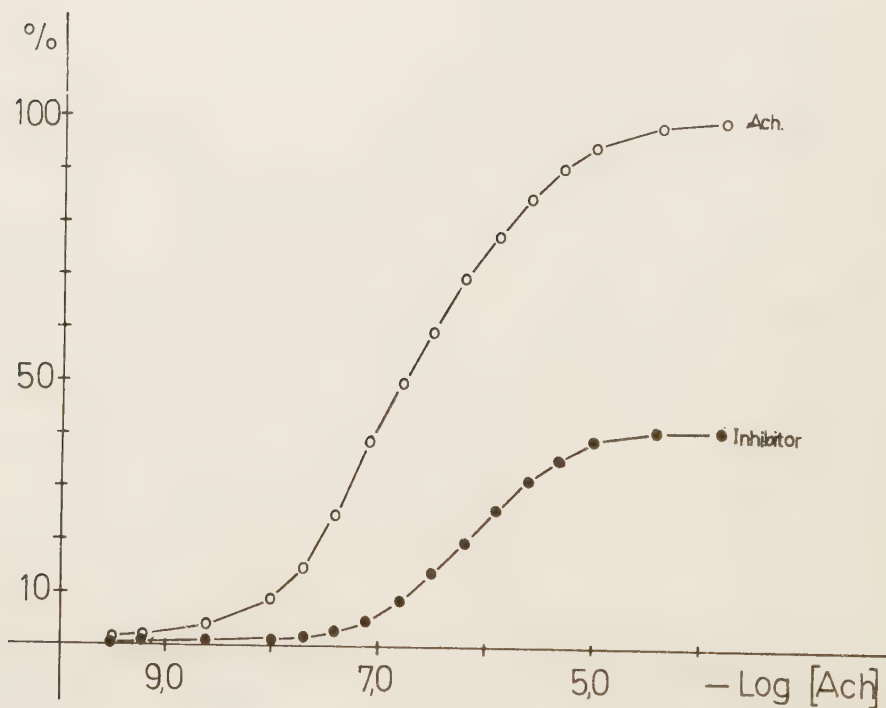
Abb. 13: Beziehung zwischen Konzentration und Wirkung von Acetylcholin am isolierten Jejunum der Ratte bei Anwesenheit von Hemmstoff 13 ($1,063 \times 10^{-5}$ Mol/l)
 ACH = unbeeinflusste Dosis-Wirkungsbeziehung



Abszisse: neg. Log. der molaren Acetylcholin-Konzentration

Ordinate: Kontraktionshöhe relativ zu der durch Acetylcholin erreichten Maximalkontraktion in %.

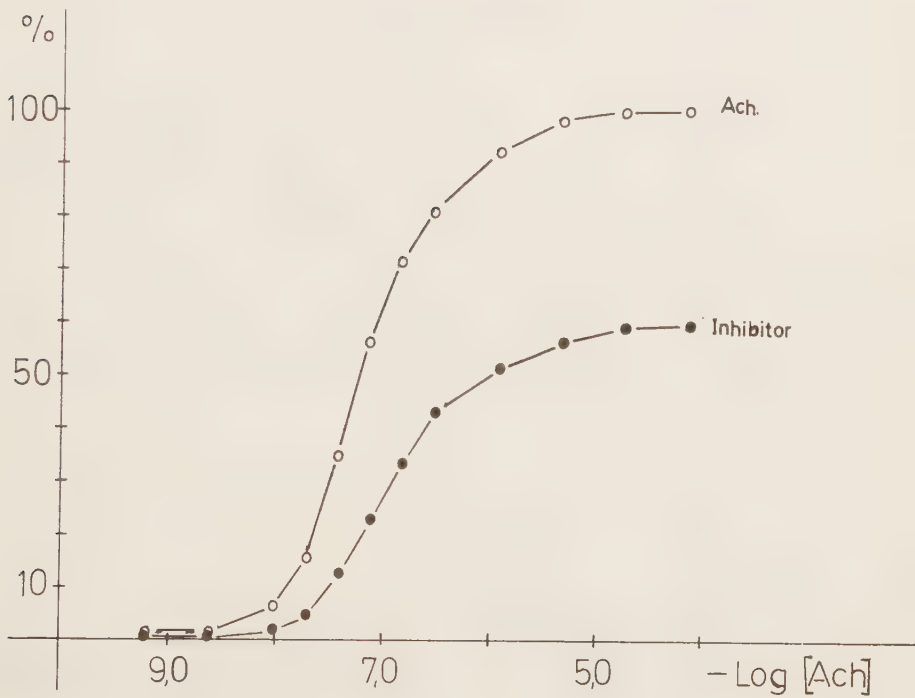
Abb. 14: Beziehung zwischen Konzentration und Wirkung von Acetylcholin am isolierten Jejunum der Ratte bei Anwesenheit von Hemmstoff 14 ($8,108 \times 10^{-6}$ Mol/l)
 ACH = unbeeinflusste Dosis-Wirkungsbeziehung



Abszisse: neg. Log. der molaren Acetylcholin-Konzentration

Ordinate: Kontraktionshöhe relativ zu der durch Acetylcholin erreichten Maximalkontraktion in %.

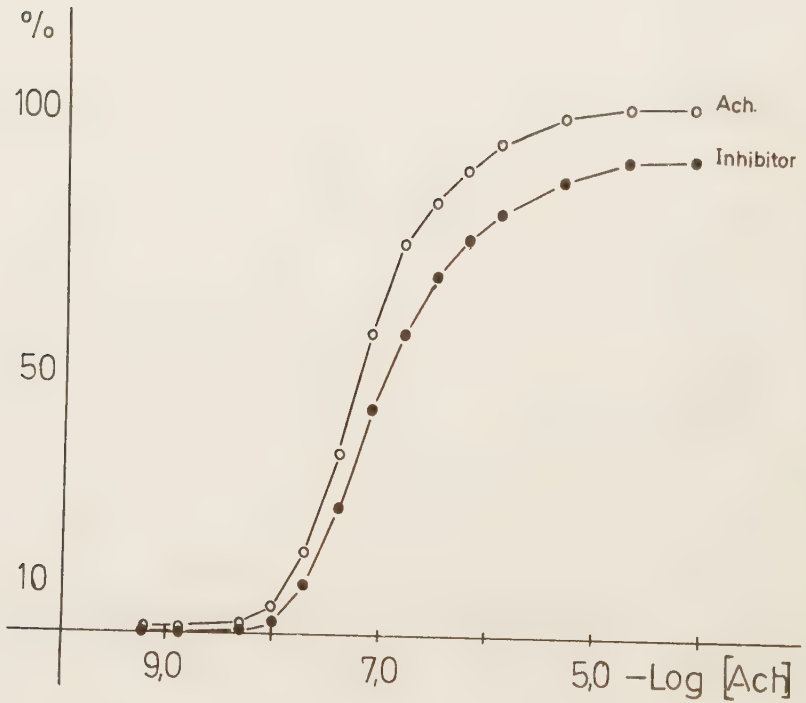
Abb. 15: Beziehung zwischen Konzentration und Wirkung von Acetylcholin am isolierten Jejunum der Ratte bei Anwesenheit von Hemmstoff 14 ($4,054 \times 10^{-6}$ Mol/l)
 ACH = unbeeinflusste Dosis-Wirkungsbeziehung



Abszisse: neg. Log. der molaren Acetylcholin-Konzentration

Ordinate: Kontraktionshöhe relativ zu der durch Acetylcholin erreichten Maximalkontraktion in %.

Abb. 16: Beziehung zwischen Konzentration und Wirkung von Acetylcholin am isolierten Jejunum der Ratte bei Anwesenheit von Hemmstoff 14 ($1,014 \times 10^{-6}$ Mol/l)
 ACH = unbeeinflusste Dosis-Wirkungsbeziehung



Abszisse: neg. Log. der molaren Acetylcholin-Konzentration
 Ordinate: Kontraktionshöhe relativ zu der durch Acetylcholin erreichten Maximalkontraktion in %.

Tab. 19: Hemmstoffkonzentration, die die maximale Kontraktions-
höhe um 50 % (= ID_{50}) vermindert

Substanz Nr.	$ID_{50} \pm$ Vertrauensbereich* Mol/l
13	$3,86 \pm 2,78 \times 10^{-5}$
14	$5,92 \pm 2,62 \times 10^{-6}$

Die inhibitorische Dosis 50 wurde durch Interpolation aus der Probitgeraden in der Hazen-Skala im Wahrscheinlichkeitsnetz erhalten.

* $\alpha = 0,05$

B/XI Bestimmung der akuten Toxizität

Anhand der Toxizitätsbestimmungen kann man die untersuchten Substanzen auf Grund ihrer unterschiedlichen Symptome in zwei Klassen einteilen, nämlich in Neuroleptika und Stoffe mit agitierenden der Wirkkomponente.

Applikation von Verbindung 13 führt innerhalb von 2 Minuten zu Agitation, Hyperreflexie und Konvulsionen, Symptomen also wie sie auch bei Überdosierung von Cocain und MAO-Hemmern beobachtet werden (14). Spätestens nach 15 Minuten trat der Tod ein, meist in der Rückenlage.

Applikation von Verbindung 14, 16, 17, 18 führte zu tiefer Sedation mit tonisch-klonischen Krämpfen, buckliger Haltung, unphysiologischer Bewegungskoordination und Gleichgewichtsstörungen. Dieser Zustand hielt etwa 20 - 25 Minuten an. Es folgte meist eine 1 - 2-minütige Exzitationsphase mit unmotivierten, sprungartigen Bewegungen, während der die Tiere starben. Überlebten sie, dann starben sie auch in der sich anschließenden 14-tägigen Beobachtungsphase nicht.

15 erwies sich als relativ untoxisch, es führte selbst in einer Dosierung von 300 mg/kg nicht zum Tod der Versuchstiere.

Nach der letalen Dosis am Menschen werden toxische Stoffe in sechs Toxizitätsklassen eingeteilt (29). Nach dieser Einteilung können die Substanzen 13, 14, 16, 17 und 18 der dritthöchsten Toxizitätsklasse ("very toxic") zugerechnet werden, wobei natürlich zu berücksichtigen ist, daß die Ergebnisse des Tierversuchs nur in den seltensten Fällen direkt auf das Testobjekt Mensch projizierbar sind.

Tab. 20: Bestimmung der akuten Toxizität durch Probitanalyse

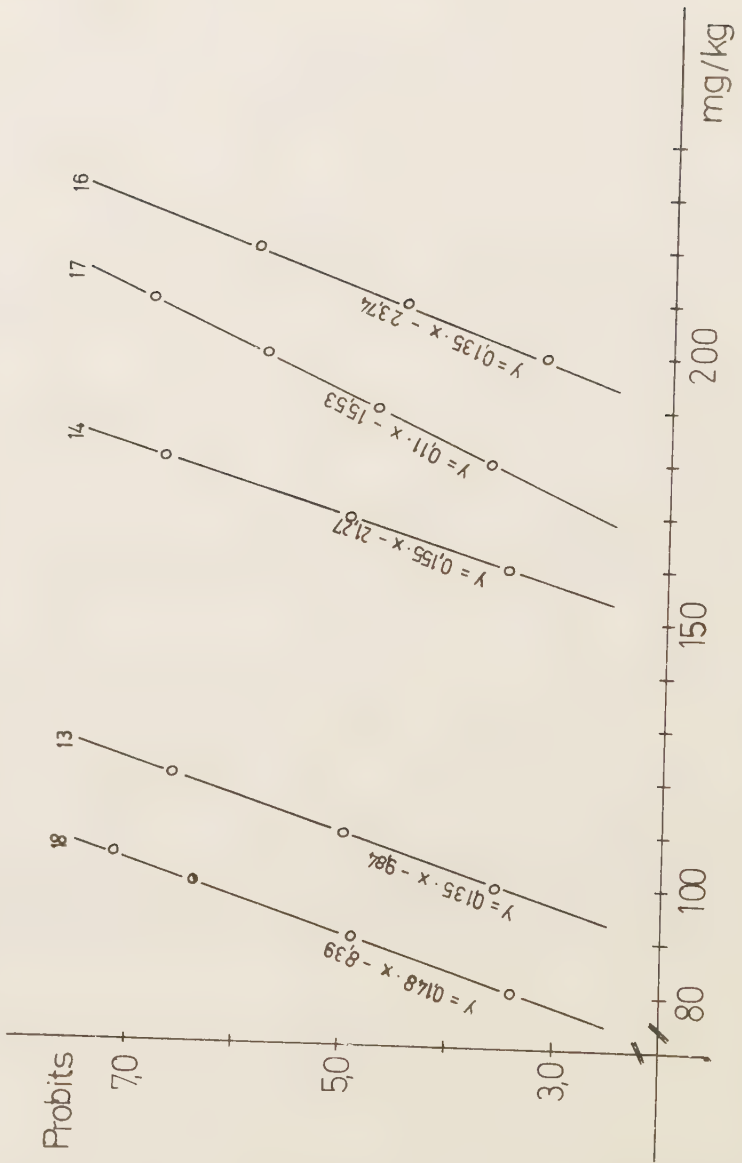
Substanz Nr.	$LD_{50} (V_u - V_o) \cdot \text{mg/kg}$ $\alpha^{**} = 0,05$	Stichproben- umfang	LD_{50} $\text{Mol/kg} \times 10^{-4}$	χ^2 ***
13	109,6 (105,7–113,4)	35	3,89	0,619
14	169,4 (166,1–172,8)	35	5,72	0,034
15	> 300	35	> 10,07	–
16	213,5 (209,6–217,3)	35	7,16	0,089
17	192,3 (187,6–197,1)	35	6,16	0,045
18	90,5 (87,1 – 93,9)	35	2,90	0,074

* untere bzw. obere Vertrauensgrenze

** Irrtumswahrscheinlichkeit 5 %

*** Anhand der χ^2 -Werte ist zu ersehen, daß keine Heterogenität vorliegt.
Die Wertbemessung kann folglich als gültig angesehen werden.

Abb. 17: Probitgeraden der Absterbehäufigkeit der Substanzen 13, 14, 16, 17 und 18



- C. Untersuchungen zu Pharmakokinetik und Metabolismus von N-L-Phenylalanyl-L-2-amino-1phenylpropan(13) und L-2-Amino-1-phenylpropan(3)

C/I Versuchsplanung

Die pharmakologische Prüfung der N-L-Phenylalanyl- β -phenylalkylamine 11 - 20 auf antidepressive Wirkung ergab als wirksamsten Vertreter Verbindung 13. Neben einer Wirkung des ungespaltenen Moleküls sind für die antidepressiven Wirkungsqualitäten von 13 das Abbauprodukt Amphetamin bzw. dessen Hydroxylierungsprodukt zu diskutieren. Die pharmakologischen Versuche lassen keine eindeutige Zuordnung zu einem der beiden Wirkungsvorgänge - Wirkung des 13-Gesamt-moleküls bzw. Wirkung des Amphetamins oder dessen Metaboliten - zu. Während die für 13 festgestellten lokalanästhetischen, zentral- und peripher-anticholinergen Wirkungsqualitäten - Eigenschaften, die für Weckamine aus der Amphetaminreihe negiert werden (34) - eindeutig für eine Wirkung des Gesamt-moleküls sprechen, bedeuten Noradrenalin-sensibilisierung (B/III), Reserpinumkehr (B/V), Hexobarbitalnarkoseverkürzung (B/IV) und Erhöhung der lokomotorischen Aktivität (B/VIII/ Wirkungscharakteristika, die auch für Amphetaminderivate beschrieben werden (34, 28, 60, 81).

Während jedoch Methamphetamin, das wirkungsschwächere Analoge des Amphetamins in einer Dosierung von 0,5 mg/kg sowohl die Spontanaktivität der Maus signifikant erhöht (34), als auch die Reserpinkatalepsie antagonisiert (34), verliert 13 in einer Dosierung von 5 mg/kg (entsprechend einer latenten Amphetaminsulfatdosierung von 3,2 mg/kg) seine motorisch-excitative Wirkung, während ihr Reserpinantagonismus erhalten bleibt. (Antagonismus von 13 zu 3?)

Zur Klärung des Wirkungsmechanismus von 13 wurden deshalb Metabolisierungsversuche im in vitro- und in vivo-System durchgeführt.

Stabilitätsprüfungen im in vitro-System wurden mit nichtmarkierter Substanz 13 durchgeführt; diese Versuche sollten einen

Anhaltspunkt für die Hauptversuche mit ^{14}C -markiertem 13 liefern, die feststellen sollen in welchen Kompartimenten des Körpers 13 eventuell in Amphetamin und Phenylalanin gespalten wird.

Eventuell vorhandene Unterschiede zwischen 3 und 13 in seinen pharmakokinetischen Eigenschaften sollte die Ganztier-Autoradiographie klären. Zusätzlich können dadurch Erkenntnisse über die Eliminationsvorgänge der Verbindung gewonnen werden.

Quantitative Plasma- und Gehirnspiegelbestimmungen und Ermittlung von Metabolitenfraktionen im Gehirn wurden zur eindeutigen Aussage über die Wirkform von 13 durchgeführt.

C/II Synthese von N-L-Phenylalanyl-L-methylen-¹⁴C-2-amino-1-phenylpropan modifiziert zur Herstellung im Mikromaßstab

Die von uns verwendete Methode lehnt sich an die von Endres W. (24) beschriebene Synthese stereoisomerer N-Aminoacyl-phenylalkylamine an. Sie wurde unter folgenden Gesichtspunkten geplant und modifiziert:

- 1.) Gute Standardisierungsmöglichkeit des Synthesewegs,
- 2.) Durchführung der Synthese mit möglichst geringem apparativen Aufwand,
- 3.) Möglichst hohe Ausbeute an reiner, razematfreier Substanz 13.

Die Modifizierung und Optimierung des Synthesewegs wurde mit nichtmarkierten Ausgangskomponenten durchgeführt. Durch Variation der Versuchsbedingungen gelang die Entwicklung eines gut reproduzierbaren Mikrostandardverfahrens, das reines, razematfreies 13 lieferte. Bei der Herstellung von markiertem 13 genügte daher die dünnenschichtchromatographische Kontrolle von Zwischenprodukten und 13. Die Substanzverluste konnten dadurch niedrig gehalten werden.

Wichtig für die Synthese von Amphetamin-freiem 13 war die Verwendung von vier Val Hydrazin bei der Abspaltung der Phthalylschutzgruppe. Eine weitere Erhöhung der Hydrazinkonzentration lieferte zwar mehr Endprodukt, das jedoch durch abgespaltenes 3 verunreinigt war. Die Abtrennung der Aminoacylverbindung 13 von ihrer Ausgangsbasis ist nur unter erheblichen Kristallisationsverlusten möglich.

Der Versuch, doppeltmarkiertes 13 unter Einsatz von ³H-Phenylalanin herzustellen, scheiterte daran, daß Tritium im Verlauf der Synthese gegen Wasserstoff ausgetauscht wurde. Im Endprodukt waren nur noch 8 % der eingesetzten Aktivität zu finden.

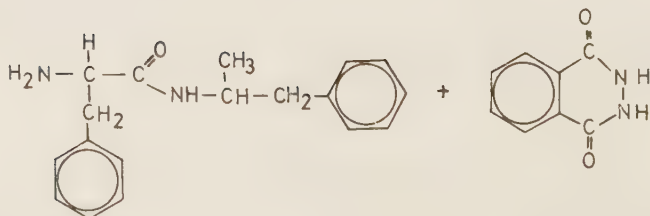
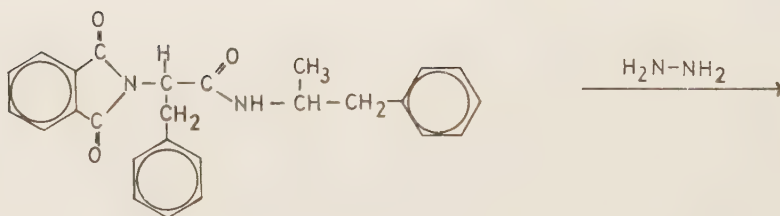
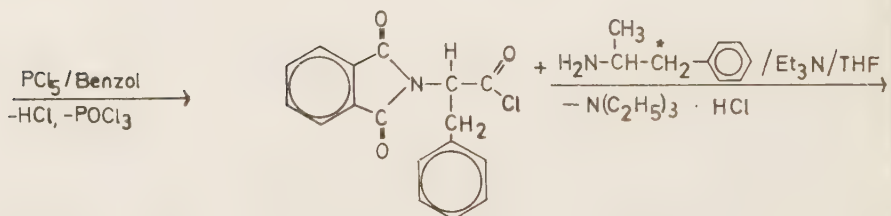
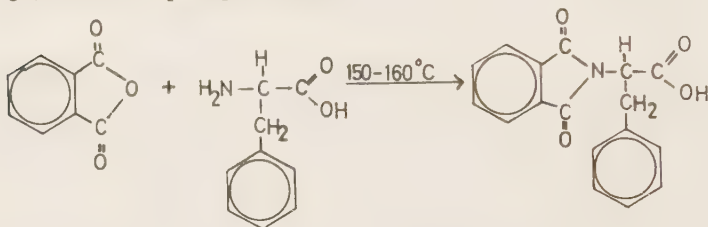
Ergebnisse:

Ausbeute: 44 % der Theorie = 46 mg (195 μ Ci)

Schmp.: 89° (Ligroin)

Reinheit: dc-rein

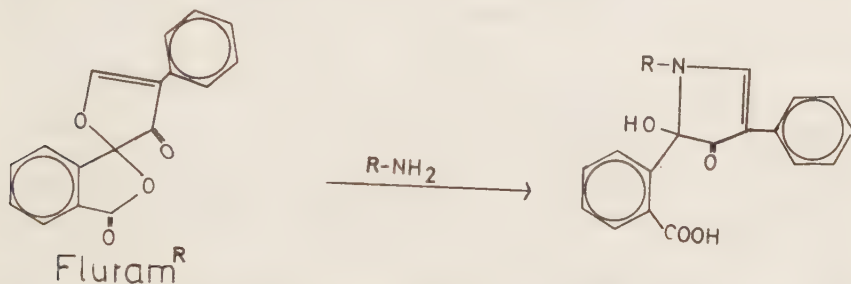
Reaktionsschema der Synthese von N-L-Phenylalanyl-L-methylen-
¹⁴C-2-amino-1-phenylpropan



* ¹⁴C-markiert

C/III Optimierung eines DC-Systems zur Auftrennung von 3, 13 und Metaboliten aus physiologischem Material

Die Entwicklung verschiedener Fließmittelsysteme in Kombination mit zwei spezifischen Detektionsmitteln ermöglichte uns, den Metabolismus von 13 dünnsschichtchromatographisch zu analysieren. Von großer Bedeutung für die Interpretation pharmakologischer Ergebnisse war dabei vor allem eine eindeutige Unterscheidungsmöglichkeit von 13 und eventuell in vivo entstehendem Spaltprodukt 3. Dies war auf Grund erheblicher R_f -Unterschiede in sämtlichen Fließmittelsystemen möglich. Als zusätzliches Kriterium dienten die unterschiedlichen Fluoreszenzen nach Besprühen mit Fluorescaminlösung bei pH 8 - 9, die eine Differenzierung bis in den Nanogramm-bereich ermöglichen.



Eventuell in vivo entstehende weitere Metaboliten (siehe Tabelle) sind anhand dieses Verfahrens eindeutig identifizierbar. Die Bestimmung der Nachweisgrenze für die Verbindungen 1, 3, 4, 13, 14 zeigte die wesentlich höhere Empfindlichkeit von Fluorescamin als Detergens für primäre Amine im Vergleich zu Ninhydrin. Die Ergebnisse für die Substanzen 1, 3, 4 entsprechen den Literaturwerten (66), 13 und 14 wurden erstmals mit dieser Methode nachgewiesen.

C/III/1.) Fließmittelsysteme:

FM 1: Methanol/Chloroform/Cyclohexan/Ammoniak 25 %	30:50:30:5 Vol. %
FM 2: Methanol/Chloroform/Cyclohexan	24:40:24 Vol. %
FM 3: Methanol/Ammoniak 25 %	99:1 Vol. %
FM 4: Methanol/Chloroform/Ammoniak 25 %	50:50:1 Vol. %

C/III/2.) Plattenmaterial:

Es wurden DC-Fertigplatten - Kieselgel 60 Merck ohne Fluoreszenz-indikator und DC-Fertigplatten - Kieselgel 60 F₂₅₄ verwendet.

C/III/3.) RF-Werte von 3, 13 und möglichen Metaboliten in unterschiedlichen Fließmittelsystemen:

Tab. 21:

Substanz	Rf-Wert FM 1	Rf-Wert FM 2	Rf-Wert FM 3	Rf-Wert FM-4
1	0,66	0,72	0,77	0,82
2	0,48	0,31	0,38	0,36
3	0,76	0,21	0,41	0,53
4	0,79	0,26	0,38	0,50
13	0,85	0,71	0,75	0,85
14	0,57	0,31	0,42	0,44
p-OH-Amph.	0,82	0,65	0,76	0,85
L-Phenylalanin	0,67	0,20	0,34	0,44
Nor-ephedrin	0,19	0,08	0,16	0,20

Tab. 22: Farbtöne von 3, 13 und möglichen Metaboliten nach Besprühen mit zwei verschiedenen Detektionsmitteln und Betrachten im UV

Substanz	Fluorescamin+ UV ₃₅₀	Ninhydrin+ Tageslicht
3	grün	gelb
4	dunkelblau	gelb
13	hellblau	weiß
14	hellblau	weiß
p-OH Amphetamin	grün	gelb
L-Phenyl alanin	blau	lila
Nor- ephedrin	hellblau	bläulich-lila
1	grün	beige
2	braun	gelb

C/III/4.) Bestimmung der Nachweisgrenzen (μg)

Tab. 23: Nachweisgrenzen (μg) für die Identifizierung von 3, 13 und möglichen Metaboliten mit Hilfe von Fluorescamin und Ninhydrin

Substanz	Fluorescamin	Ninhydrin
1	0,040	5
3	0,040	20
4	0,400	20
13	0,010	10
14	0,020	15

C/IV In vitro Stabilitätsprüfungen von 13

Auf Grund von Untersuchungen mit künstlichem Magen- und Darmsaft kann angenommen werden, daß 13 im Magen-Darmtrakt keine Spaltung in Amphetamin und Phenylalanin erfährt. Die durchgeführten Versuche erstreckten sich über einen Kontrollzeitraum von 3 Tagen.

Zur Klärung der Frage, ob eine Metabolisierung von 13 zu Phenylalanin, Amphetamin und dessen Folgemetaboliten in der Leber stattfindet, wurden in in-vitro Versuchen mit einem 9000 g Überstand von Mäuseleberhomogenat vorgenommen. Nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden traten Spaltprodukte wie 3 auf. In pharmakologischen Versuchen war zu diesem Zeitpunkt keine Motilitätserhöhung mehr feststellbar. Im Gegensatz zu diesem Versuch führte die Inkubation von Aminopeptidase M (EC 3.4.11.2), einer Aminosäurearylamidase aus der mikrosomalen Fraktion der Schweineniere, bereits nach 1 Stunde zum Auftreten merklicher Amphetaminmengen. Es ist anzunehmen, daß dieses Enzym, das hauptsächlich in der Niere und Leber lokalisiert ist, an der in vivo-Spaltung von 13 wesentlich beteiligt ist.

Der im Leberhomogenat verzögerte Spaltungseintritt dürfte seine Ursache wohl hauptsächlich in der zu geringen Enzymaktivität der Präparation haben. Zum einen sind nämlich für die Aminopeptidase, isoliert von Ratten- und Mäuselebern, zweiwertige Metalle als Aktivatoren nötig, was beim Schweinenierenenzym nicht erforderlich ist (45), zum anderen ist die spezifische Aktivität im Organhomogenat sehr niedrig und führt erst durch Isolierung lysosomaler Organelle zu 20 - 40-fach höheren Aktivitäten (45).

Andere Autoren haben festgestellt, daß bei der Herstellung des Leberhomogenats bereits eine Zentrifugationsgeschwindigkeit von 15000 g ausreicht, um erhebliche Aktivitäten des Enzyms im Niederschlag nachweisen zu können (71).

C/V Bestimmung der renalen und rectalen Eliminationsrate von 13

Die Aktivitätsausscheidung über Urin und Faeces bei Mäusen wurde nach intraperitonealer Applikation von 13 in Abhängigkeit von der Zeit bis 48 Stunden post appl. als prozentualer Anteil der verabreichten Gesamtaktivität bestimmt. Tab. 24 gibt eine Übersicht über die gefundenen Werte. Daraus ist zu ersehen, daß die renale Elimination Hauptausscheidungsweg ist. Die Eliminationshalbwertszeit für Harn und Faeces wurde nicht bestimmt, da sie unterhalb 4 Stunden liegt, und in diesem Zeitabschnitt keine Werte vorlagen.

Auffallend hoch ist die faecale Ausscheidungsrate. Ob sie applikationsbedingt ist, oder ob sie auf biliäre Elimination zurückzuführen ist, wurde nicht geklärt.

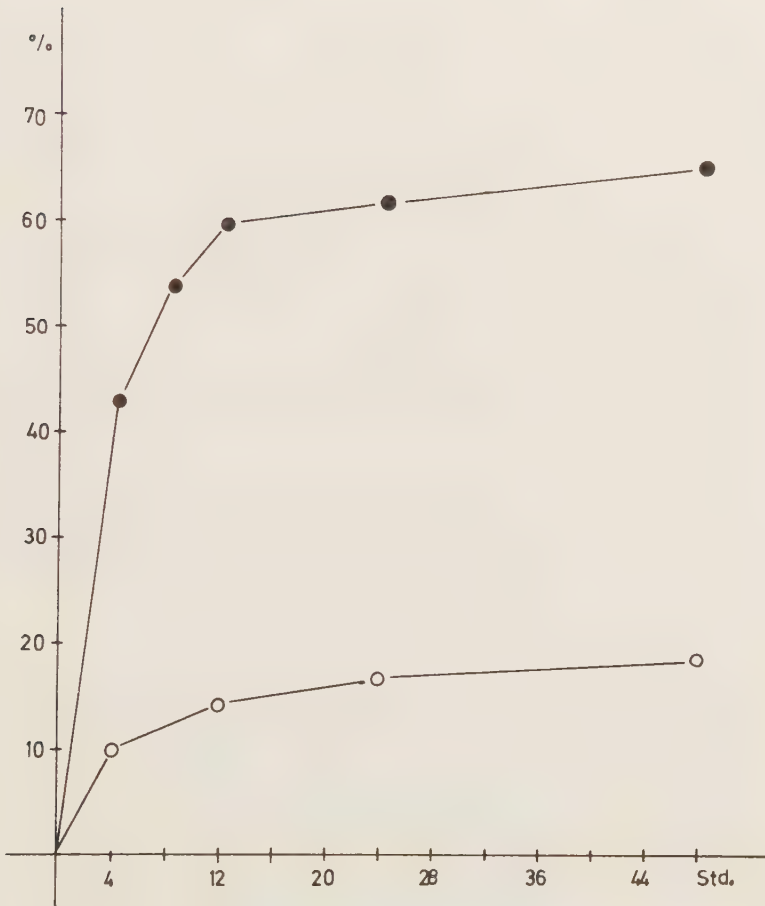
Da nach 48 Stunden 85 % der applizierten Dosis via Harn und Faeces ausgeschieden sind, kann man die Elimination der Substanz nach dieser Zeit als beendet betrachten. Einen bemerkenswerten Anteil der Differenz zu 100 % dürfte die durch starken Speichelfluß bedingte, nicht erfaßbare Ausscheidungsrate betragen. Die Elimination durch die Atemluft war minimal; sie wurde vernachlässigt.

Tab. 24: Bestimmung der renalen und rectalen Eliminationsrate
von 13 an männlichen NMRI Mäusen

Zeit Std.	Faeces % A _G *	Harn % A _G *	Faeces + Harn % A _G *
4	10,21	42,86	53,07
8	11,20	54,10	65,30
12	14,22	60,08	74,30
24	16,92	62,49	79,41
48	19,39	65,89	85,28

* Pro Tier applizierte ¹⁴C-Gesamtaktivität

Abb. 18: Renale und rectale Eliminationsrate von 13 nach
i.p. Applikation von 30 mg/kg an männlichen NMRI
Mäusen



Ordinate: Ausgeschiedene Aktivität in % der applizierten Gesamtaktivität

Abszisse: Zeit in Stunden

Harn ● — ●

Faeces ○ — ○

C/VI Ganztier-Autoradiographie von 13 und 3

Die Verteilungsprofile von 3 und 13 zu unterschiedlichen Zeiten (1/4, 1/2, 1,0, 2,0 und 4,0 Std.) nach oraler und intraperitonealer Applikation wurden qualitativ an männlichen Mäusen mittels Ganzkörper-Autoradiographie untersucht. Abbildung 19 - 23 zeigen einige Autoradiogramme dieses Versuchs. Helle Zonen deuten hohe ^{14}C -Aktivität an, dunkle Zonen sind substanzfrei. Anhand dieser Untersuchungen ist zu sehen, daß nicht nur 3 (Abb. 19a/ 1/4 und 1/2, Abb. 20/ 2 und 4) sondern auch 13 (Abb. 21/ 1/4 - 2 und Abb. 22/ 1/2 - 4) - wenn auch in etwas geringerer Konzentration - die Blut-Gehirn-Schranke durchdringt. Während jedoch von Amphetamin (3) i.p. verabreicht nach 2 Stunden kaum noch Aktivität im Gehirn registrierbar ist (Abb. 19a), kann man i.p. verabreichtes 13 auch nach 2 Stunden noch deutlich dort erkennen (Abb. 21). Das Wirkungsmaximum dürfte nach i.p. Applikation bei beiden Verbindungen bereits nach 15 - 30 Minuten erreicht sein (Abb. 19a und 21). Zu diesem Zeitpunkt ist die Konzentration im Gehirn am höchsten.

Orale Applikation verzögert nicht nur den Wirkungseintritt, sondern senkt in hohem Maße die Resorptionsquoten. Gehirnspiegelmaksimas liegen dabei für 3 und 13 erst 2 Stunden nach Verabreichung vor (Abb. 20 und 22).

Auf Grund der hohen Aktivitäten, die bei sämtlichen Schnitten im Nierenfilter und Nierenbecken zu sehen sind (Abb. 21/ 1/4 und 2, Abb. 20/ 2 und 4/), kann man annehmen, daß die renale Elimination der Hauptausscheidungsweg für 3 und 13 ist. Die im Gegensatz zu 3 erheblich stärkere Substanzanhäufung von 13 im Gastrointestinaltrakt (Abb. 21) deutet in Verbindung mit der hohen Aktivität in der Gallenblase (Abb. 19/ 1) eine Sekundärresorption im enterohepatischen Kreislauf an, womit die Wirkungsverlängerung von 13 erklärbar wäre (siehe B/VIII).

Hohe Radioaktivität findet sich erwartungsgemäß für 3 und 13 in der Leber, dem Hauptorgan der Biotransformation (Abb. 19a/ 1/4 und 1/2, Abb. 21/ 1/4 und 1/2). Bemerkenswert wäre noch die Einwirkung von 3 und 13 auf Speicheldrüse, Tränendrüse und perioculare Struk-

turen (Abb. 21/ 1/2, Abb. 19a/ 1/2), wie sie auch bei Ganzkörper-Autoradiographiestudien von DL-Norephedrin an der Ratte erwähnt werden (77). Starker Speichelfluß verursacht die Aktivität, die wie auf manchen Abbildungen (Abb. 19a/ 2) zu sehen ist, auf der Haut, in Mund- und Halsgegend auftritt.

Eine Anreicherung in Lunge und Herz konnte nicht nachgewiesen werden. Der graue Farbton in den meisten Körpergeweben im Gegensatz zum Schwarz der substanzfreien Zonen, deutet auf eine gleichmäßige Verteilung der Substanzen in diesen Gebieten hin.

Abb. 19: Ganzkörper-Autoradiogramm 1 Stunde nach
i.p. Applikation von ¹³¹I (Maus)

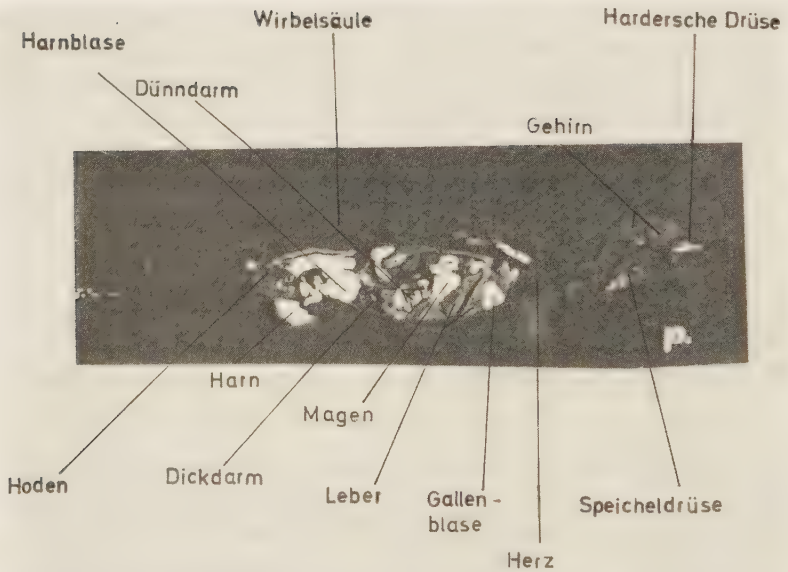
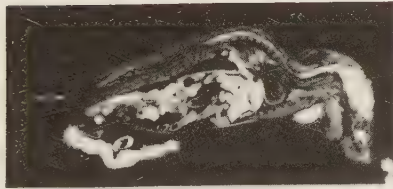
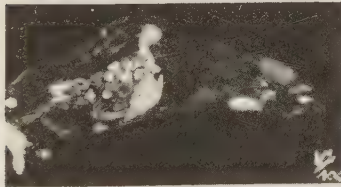


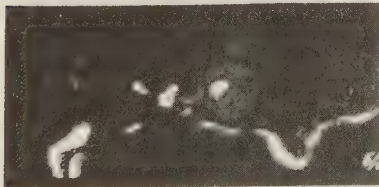
Abb. 19a: Ganzkörper-Autoradiogramme von Mäusen
1/4, 1/2, 1 und 2 Stunden nach i.p.
Applikation von 3



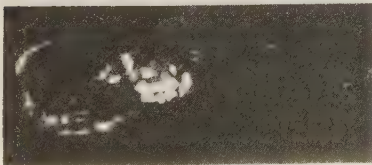
1/4



1/2



1,0



2,0

Abb. 20: Ganzkörper-Autoradiogramme von Mäusen
1/4, 1/2, 1 und 2 Stunden nach oraler
Applikation von 3

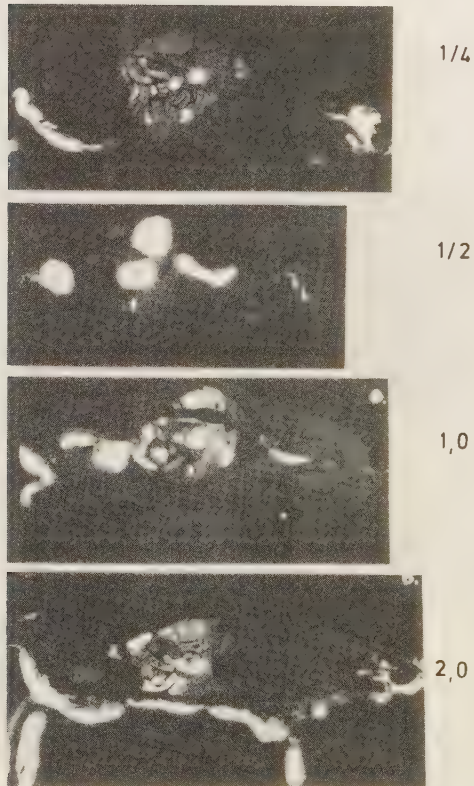


Abb. 21: Ganzkörper-Autoradiogramme von Mäusen
1/4, 1/2, 2,0 und 4 Stunden nach i.p.
Applikation von 13



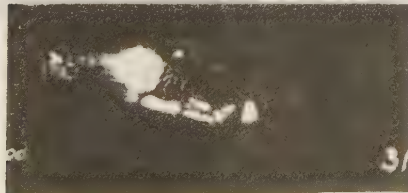
1/4



1/2

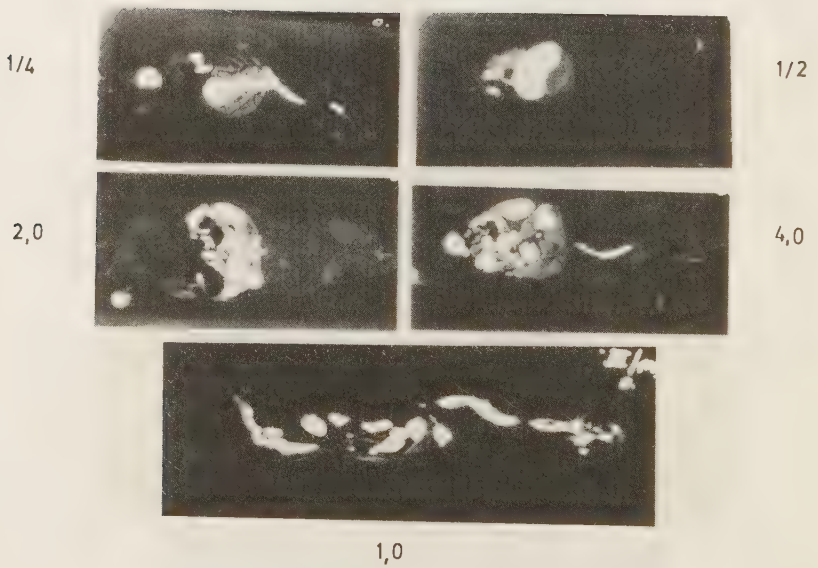


2,0



4,0

Abb. 22: Ganzkörper-Autoradiogramme von Mäusen 1/4, 1/2, 1,0, 2,0 und
4 Stunden nach oraler Applikation von 13



C/VII Quantitative Verteilung von 13 in verschiedenen Organen
der Maus zu unterschiedlichen Zeiten nach i.p. Applikation

Die Verteilung von 13 in verschiedenen Organen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach i.p. Applikation wurde anhand der ^{14}C -Aktivität, gemessen nach Verbrennung der Proben im Packard Tri Carb Sample Oxidizer, bestimmt. In Tab. 25 ist die Verteilung als prozentualer Anteil der applizierten Gesamtaktivität widergegeben. Die Kompartimente mit den höchsten Substanzkonzentrationen sind: Gastrointestinaltrakt, Leber und Nieren. Ansteigender Gehalt im Magen mit zunehmender Versuchsdauer, dürfte durch Diffusion der basischen Verbindung 13 vom Blut in den Magen bedingt sein, was zu einem gastroenteralen Kreislauf führt. Die hohen 13-Konzentrationen im Darm sind mit dem Vorliegen von enterohepatischen und gastroenteralen Kreisläufen erklärbar.

Der konstante Nierenspiegel während der ersten Stunde läßt die renale Ausscheidung eines Großteils der Substanz in dieser Phase vermuten. Nach 2 und 4 Stunden zeigen sich deutliche Konzentrationsverminderungen in diesem Organ. Inwieweit diese Werte mit der Eliminationsrate korrelieren, wurde nicht untersucht.

Addiert man den prozentualen Gehalt in den untersuchten Organen, summiert mit Blut- und Gehirnspeigel und berücksichtigt die renale Elimination, so verbleibt eine doch erhebliche Differenz zur applizierten Gesamtaktivität, was eine reichliche Verteilung in Fett-, Muskel- und anderen Körpergeweben annehmen läßt, auf die schon bei der Ganzkörper-Autoradiographie hingewiesen wurde.

Tab. 25: Prozentuale Verteilung von ^{14}C -13 in verschiedenen Organen nach unterschiedlichen Wirkzeiten

Dosis: 30 mg/kg
 Applikationsart: i.p. (0,01 ml/g Tier)
 ^{14}C -Aktivität der Injektionslösung: 7407033 dpm/ml

	Wirkzeit (Std.)					
Organe	0,25	0,50	1,00	2,00	4,00 Std.	
Darm	20,13	17,84	20,74	15,42	15,49	% A_G^*
Magen	3,88	6,10	5,62	6,15	2,30	
Leber	7,03	6,27	5,55	2,01	1,34	
Niere	3,87	3,82	3,84	1,52	0,55	
Galle	0,38	0,30	0,23	0,09	0,04	
Hoden	1,68	1,11	1,32	0,62	0,37	
Herz	0,46	0,21	0,20	0,06	0,02	
Lunge	1,37	0,93	0,85	0,23	0,09	

* A_G = applizierte Gesamtaktivität

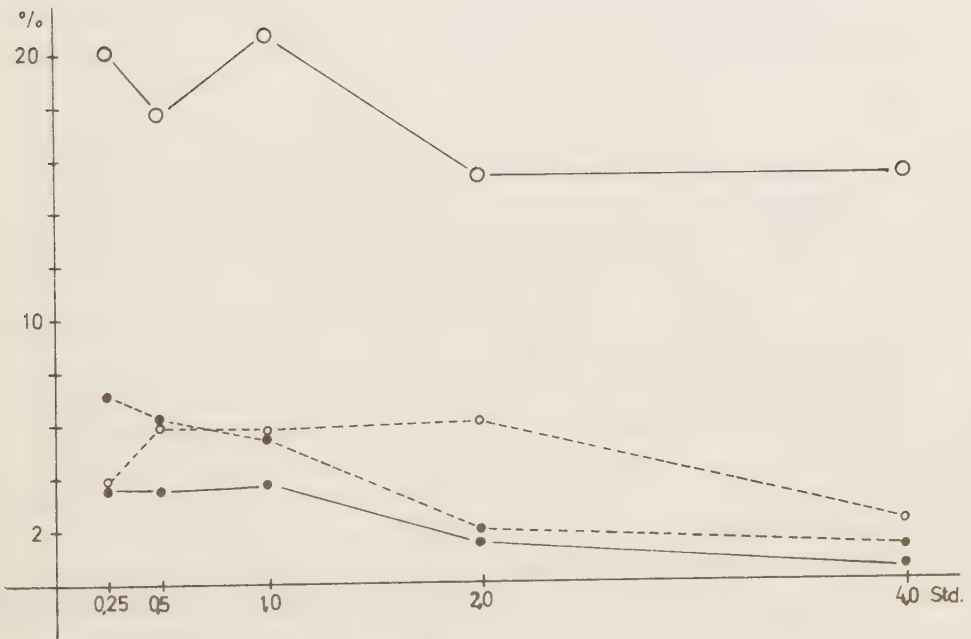


Abb. 23: Prozentuale Verteilung von Substanz 13 in Darm, Magen, Leber und Herz nach unterschiedlichen Wirkzeiten

Abszisse: Wirkzeit (t) in Stunden

Ordinate: Prozentualer Gehalt

Darm ○ — ○

Magen ○ - - - ○

Niere ● — ●

Leber ● - - - ●

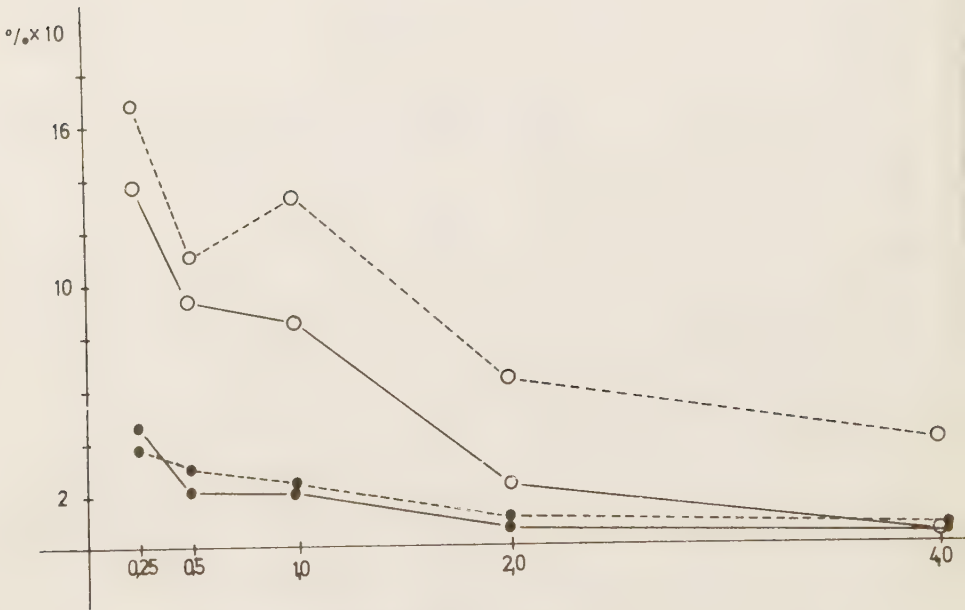


Abb. 24: Prozentuale Verteilung von Substanz 13 in Lunge, Herz,
Galle und Hoden nach unterschiedlichen Wirkzeiten

Abszisse: Wirkzeit (t) in Stunden

Ordinate: Prozentualer Gehalt $\times 10^{+1}$

Lunge ○ — ○

Hoden ○ - - ○

Herz ● — ●

Galle ● - - ●

C/VIII Bestimmung der Gesamtktivität im Gehirn und Blutplasma
zu unterschiedlichen Zeiten nach i.p. Applikation von
13 und 3

Der wesentlich höhere Gehirnspiegel von 3 (2,49 %) im Vergleich zu 13 (1,87 %) im Zusammenhang mit den unterschiedlichen Plasmaspiegeln von 3 (0,48%) und 13 (0,85%) bei Applikation äquimolarer Mengen 3 und 13 lassen eine höhere Passage der Blut-Gehirn-Schranke für 3 annehmen.

Im Gegensatz zu 13, das seine höchste Konzentration im Gehirn bereits nach 15 Min. erreicht hat, steigt der Gehirnspiegel von Substanz 3 bis 30 Min. post appl. und besitzt nach 2 Stunden immer noch eine Konzentration in der Größenordnung der Maximalkonzentration von 13.

Bemerkenswert ist auch der unterschiedliche Verlauf der Plasmaspiegelkurven beider Substanzen. Während 13 zumindest bis 1 Std. post appl. annähernd exponentiellen Abfall zeigt, folgt bei Verbindung 3 gegenläufig zum Konzentrationsanstieg im Gehirn einer Erniedrigung im ersten Bestimmungszeitraum (1/4 - 1/2 Std.) in der nächsten halben Stunde ein Anstieg auf den Maximalwert. Offensichtlich wird von dieser Substanz ein nicht unwesentlicher Anteil der resorbierten Menge in der Leber zurückgehalten, dort metabolisiert und als nicht gehirngängiger Metabolit wieder ins Blut abgegeben, was in Verbindung mit dem gleichzeitigen Absinken des Gehirnspiegels dieses Phänomen erklären könnte.

Plasma- und Gehirnspiegel von 3 wurden nur innerhalb der Wirkungsphase im Motilitätstest (2 Std.) untersucht.

Tab. 26: Bestimmung der ^{14}C -Gesamtaktivität im Gehirn nach i.p. Applikation von 19,4 mg/kg Amphetaminsulfat an männlichen NMRI-Mäusen

Wirkdauer (Stunden)	Tiergewicht g	Applizierte ^{14}C -Aktivität dpm	^{14}C -Aktivität im Gehirn	^{14}C -Aktivität im Gehirn Applizierte ^{14}C -Aktivität $\times 10^{-2}$ (Q)	Mittelwert (Q) $\bar{x}$
0,25	25,6	2300096	51217,69	2,23	2,49
	23,8	2138371	57220,09	2,68	
	23,9	2147356,97	54962,55	2,56	
0,50	24,0	2156340	62146,24	2,88	2,56
	25,5	2291112	56699,31	2,47	
	25,7	2309081	53777,32	2,33	
1,00	23,3	2093447	40880,77	1,95	1,98
	23,3	2093447	43569,55	2,03	
	24,0	2156340	42002,53	1,95	
2,00	25,5	2291112	39204,28	1,71	1,72
	24,1	2165325	37547,47	1,73	
	24,1	2165325	37471,21	1,73	

Tab. 27: Bestimmung der ^{14}C -Gesamtaktivität im Gehirn nach i.p. Applikation von 30,0 mg/kg ^{13}C an männlichen NMRI-Mäusen

Wirkdauer (Stunden)	Tiergewicht g	Applizierte ^{14}C -Aktivität dpm	^{14}C -Aktivität im Gehirn	$\frac{^{14}\text{C}\text{-Aktivität im Gehirn}}{\text{Applizierte } ^{14}\text{C}\text{-Aktivität}} \times 10^{+2}$ (Q)	Mittelwert (Q) $\bar{x}$
0,25	26,0	1925828	35864,40	1,86	1,87
	26,0	1925828	37620,44	1,95	
	25,5	1888793	33956,78	1,80	
0,50	26,5	1962863	22079,20	1,12	1,12
	28,0	2073969	23582,13	1,14	
	27,6	2044341	22708,40	1,11	
1,00	29,0	2148039	14620,32	0,68	0,71
	25,0	1851758	13549,25	0,73	
	25,0	1851758	13410,54	0,72	
2,00	29,0	2148039	4275,70	0,199	0,207
	28,0	2073968	4676,10	0,225	
	30,0	2222110	4344,34	0,196	
4,00	26,0	1925828	1848,99	0,096	0,101
	27,0	1999898	1873,30	0,094	
	25,0	1851758	2113,54	0,114	

Tab. 28: Plasmespiegel von 3 zu unterschiedlichen Wirkzeiten nach i.p. Applikation

Tier Nr.	Gewicht (g)	A_G (dpm)	B_E (ml)	P_E (ml)	A_{P_E} (dpm)	A_P / ml E (dpm)	B_G^* (ml)	P_G (ml)	$\frac{P_E}{P_G} \%$	A_{P_G} (dpm)	$\frac{A_{P_G}}{A_G} \times 10^{-3}$ (Q)	Q_c (x)	T Std.
1	25,6	2300096	0,9	0,52	4215	7296	1,97	1,14	57,77	8317	3,62		0,25
2	23,8	2138371	0,9	0,56	5538	8900	1,83	1,14	62,22	10146	4,74	4,79	
3	23,8	2147356	1,0	0,60	7033	11722	1,83	1,10	60,00	12894	6,00		
1	24,0	2156340	0,8	0,48	3979	6631	1,85	1,11	60,00	7360	3,40		0,50
2	25,5	2291112	0,8	0,46	3854	6703	1,96	1,13	57,50	7574	3,40	3,37	
3	25,7	2309081	0,8	0,48	3955	6591	1,98	1,19	60,00	7843	3,40		
1	23,3	2093447	0,8	0,48	6872	11453	1,79	1,07	60,00	12255	5,85		1,00
2	23,3	2093447	0,8	0,47	6197	10548	1,79	1,05	58,75	11075	5,29	5,68	
3	24,0	2156340	0,8	0,48	6866	11443	1,85	1,11	60,00	12702	5,89		
1	25,5	2291112	0,7	0,41	4190	7153	1,96	1,15	58,57	8226	3,59		2,00
2	24,1	2165325	0,8	0,47	4086	6954	1,85	1,09	58,75	7580	3,50	3,48	
3	24,1	2165325	0,8	0,46	3924	6824	1,85	1,06	57,50	7233	3,34		

A_G Applizierte Gesamtaktivität
 B_E Entnommenes Blut
 P_E Plasma des entnommenen Blutes
 B_G Gesamtblut des Tieres*
 (1/13 des Körpergewichts)

P_G Gesamtplasma gewonnen aus B_G
 A Aktivität (dpm)
 T Wirkzeit

* Theoretischer Wert

Tab. 27: Bestimmung der ^{14}C -Gesamtaktivität im Gehirn nach i.p. Applikation von 30,0 mg/kg ^{13}C an männlichen NMRI-Mäusen

Wirkdauer (Stunden)	Tiergewicht g	Applizierte ^{14}C -Aktivität dpm	^{14}C -Aktivität im Gehirn	$\frac{^{14}\text{C}\text{-Aktivität im Gehirn}}{\text{Applizierte } ^{14}\text{C}\text{-Aktivität}} \times 10^{+2}$ (Q)	Mittelwert (Q) $\bar{x}$
0,25	26,0	1925828	35864,40	1,86	1,87
	26,0	1925828	37620,44	1,95	
	25,5	1888793	33956,78	1,80	
0,50	26,5	1962863	22079,20	1,12	1,12
	28,0	2073969	23582,13	1,14	
	27,6	2044341	22708,40	1,11	
1,00	29,0	2148039	14620,32	0,68	0,71
	25,0	1851758	13549,25	0,73	
	25,0	1851758	13410,54	0,72	
2,00	29,0	2148039	4275,70	0,199	0,207
	28,0	2073968	4676,10	0,225	
	30,0	2222110	4344,34	0,196	
4,00	26,0	1925828	1848,99	0,096	0,101
	27,0	1999898	1873,30	0,094	
	25,0	1851758	2113,54	0,114	

Tab. 28: Plasmaspiegel von 3 zu unterschiedlichen Wirkzeiten nach i.p. Applikation

Tier Nr.	Gewicht (g)	A_G (dpm)	B_E (ml)	P_E (ml)	A_{P_E} (dpm)	A_P / ml E (dpm)	B_G^* (ml)	P_G (ml)	$\frac{P_E}{B_E} \%$	A_{P_G} (dpm)	$\frac{A_P}{A_G} \times 10^3$ (Q)	$Q_{\bar{x}}$ (x)	T Std.
1	25,6	2300096	0,9	0,52	4215	7296	1,97	1,14	57,77	8317	3,62		
2	23,8	2138371	0,9	0,56	5538	8900	1,83	1,14	62,22	10146	4,74	4,79	0,25
3	23,8	2147356	1,0	0,60	7033	11722	1,83	1,10	60,00	12894	6,00		
1	24,0	2156340	0,8	0,48	3979	6631	1,85	1,11	60,00	7360	3,40		0,50
2	25,5	2291112	0,8	0,46	3854	6703	1,96	1,13	57,50	7574	3,40	3,37	
3	25,7	2309081	0,8	0,48	3955	6591	1,98	1,19	60,00	7843	3,40		
1	23,3	2093447	0,8	0,48	6872	11453	1,79	1,07	60,00	12255	5,85		1,00
2	23,3	2093447	0,8	0,47	6197	10548	1,79	1,05	58,75	11075	5,29	5,68	
3	24,0	2156340	0,8	0,48	6866	11443	1,85	1,11	60,00	12702	5,89		
1	25,5	2291112	0,7	0,41	4190	7153	1,96	1,15	58,57	8226	3,59		2,00
2	24,1	2165325	0,8	0,47	4086	6954	1,85	1,09	58,75	7580	3,50	3,48	
3	24,1	2165325	0,8	0,46	3924	6824	1,85	1,06	57,50	7233	3,34		

A_G Applizierte Gesamtaktivität
 B_E Entnommenes Blut
 P_E Plasma des entnommenen Blutes
 B_G Gesamtblut des Tieres*
 (1/13 des Körpergewichts)

P_G Gesamtplasma gewonnen aus B_G
 * Theoretischer Wert

A Aktivität (dpm)
 T Wirkzeit

Tab. 29: Plasmaspiegel von 13 zu unterschiedlichen Wirkzeiten nach i.p. Applikation

Tier Nr.	Gewicht (g)	A_G (dpm)	B_E (ml)	P_E (ml)	A_{P_F} (dpm)	A_F /ml (dpm)	B_G	$\frac{P_{E\%}}{B_E}$	P_G (ml)	A_{P_G} (dpm)	$\frac{A_{P_G} \times 10^{+3}}{A_G}$ (Q)	$Q_{(x)}$	T Std.
1	26,0	1925828	1,20	0,70	8232	11760	2,00	58,33	1,17	13759	7,14		
2	26,0	1925828	1,10	0,62	12550	20242	2,00	56,36	1,13	22873	11,88	8,52	0,25
3	25,5	1888793	1,30	0,75	8190	10920	1,96	57,69	1,13	12339	6,53		
1	26,5	1962863	1,35	0,78	7410	9500	2,04	57,78	1,18	11210	5,71		
2	28,0	2073969	1,40	0,80	12973	16216	2,15	57,14	1,23	21081	10,16	6,27	0,50
3	27,6	2044341	1,35	0,75	6568	8757	2,12	55,56	1,18	10333	5,05		
1	29,0	2148039	1,10	0,62	2691	4340	2,23	56,36	1,26	5468	2,55		
2	25,0	1851758	1,20	0,70	5580	7971	1,92	58,33	1,12	8928	4,82	3,99	1,00
3	25,0	1851758	1,25	0,73	5562	7619	1,92	58,41	1,12	8533	4,60		
1	29,0	2148039	1,10	0,64	3542	5534	2,23	58,18	1,30	7194	3,35		
2	28,0	2073968	1,40	0,80	5925	7406	2,15	57,14	1,23	9109	4,39	3,84	2,00
3	30,0	2222110	1,30	0,75	4732	6309	2,31	57,69	1,33	8391	3,78		
1	26,0	1925828	1,20	0,70	3564	5091	2,00	58,33	1,17	5957	3,09		
2	27,0	1999898	1,35	0,78	4567	5855	2,08	57,78	1,20	7026	3,51	3,23	4,00
3	25,0	1851758	1,30	0,75	3850	5133	1,92	57,69	1,11	5697	3,08		

A_G Applizierte Gesamtaktivität

B_G Gesamtblut des Tieres*

A Aktivität (dpm)

B_E Entnommenes Blut

(= 1/13 des Körpergewichts)

T Wirkzeit

P_E Plasma des entnommenen Blutes

P_G Gesamtplasma gewonnen aus B_G

*Theoretischer Wert

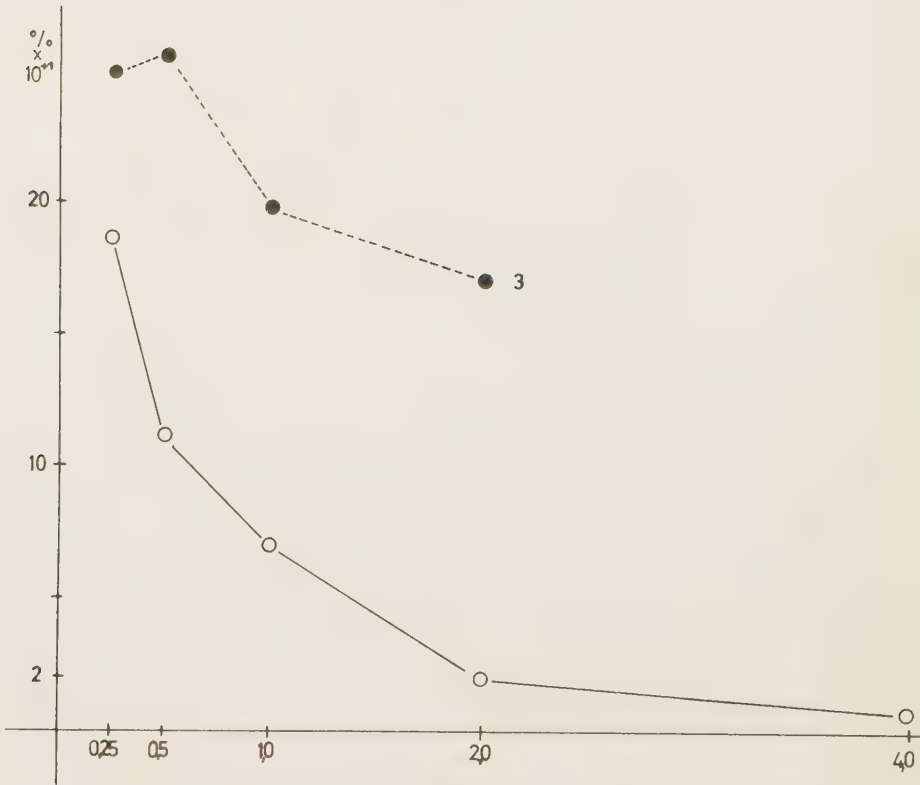


Abb. 25: Gehirnspiegel nach i.p. Applikation von 19,4 mg/kg (Substanz 3)
bzw. 30 mg/kg (Substanz 13) nach unterschiedlichen Wirkzeiten

Abszisse: Wirkzeit (t) in Stunden

Ordinate: Prozentualer Gehalt $\times 10^{-1}$

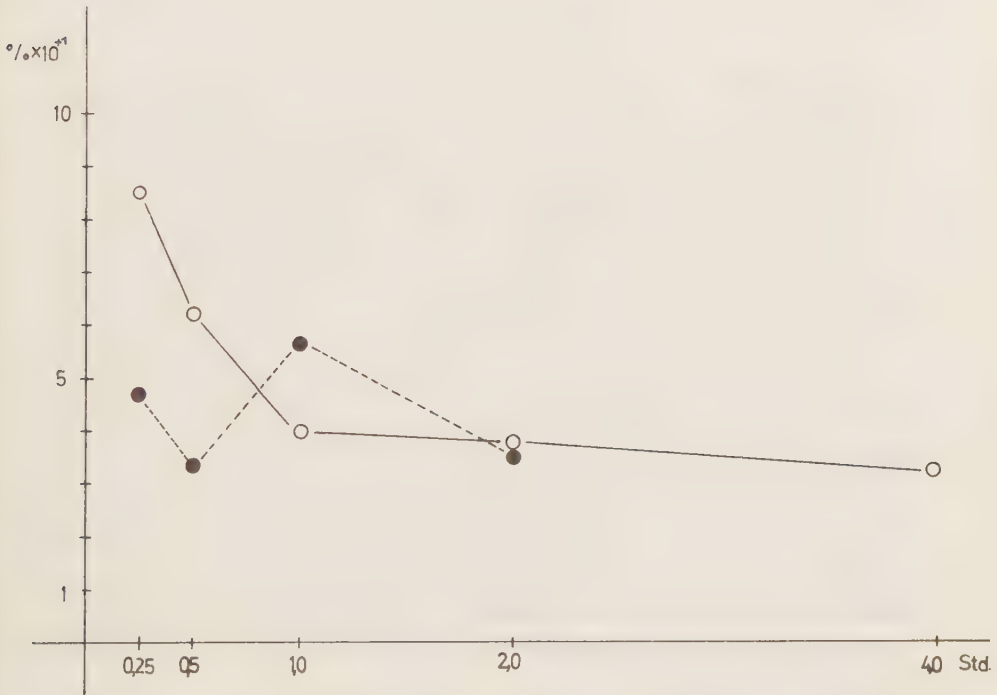


Abb. 26: Plasmaspiegel nach i.p. Applikation von 19,4 mg/kg (Substanz 3)
bzw. 30 mg/kg (Substanz 13) nach unterschiedlichen Wirkzeiten

Abszisse: Wirkzeit (t) in Stunden

Ordinate: Prozentualer Gehalt $\times 10^{+1}$

C/IX Bestimmung von Metabolitenfraktionen im Gehirn

Aus den Untersuchungen zum Metabolismus von Verbindung 13 im Gehirn geht hervor, daß der Hauptanteil (95,2 %) der HCl-löslichen ^{14}C -Aktivität im pH 13- CHCl_3 -Extrakt (Fraktion I, 13 und 3) erscheint. Hydroxylierte Metaboliten (pH 9- CHCl_3 -Extrakt, Fraktion II) wurden in der ersten Viertelstunde nach Verabreichung nur in Mengen bis zu 4,8 % festgestellt, stiegen jedoch innerhalb des Untersuchungszeitraumes von 4 Stunden auf einen prozentualen Anteil von ca. 15 % an. Die neutrale Fraktion (wässrige Fraktion der pH 9 - Ausschüttelung) war praktisch aktivitätsfrei. Im Verlauf des Versuchs konnte in Fraktion I ein kontinuierlicher Abfall von 13 und 3 festgestellt werden. Dabei veränderte sich jedoch das Verhältnis 3/13 von 1,43 nach 1/4 Stunde auf 3,56 nach 4 Stunden. Die in B/VIII festgestellte gleichmäßig erhöhte Spontanmotilität über einen Zeitraum von 4 Stunden bei i.p. Applikation von 30 mg/kg 13 resultiert möglicherweise aus der abnehmenden Amphetaminkonzentration bei einer gleichzeitig erheblich stärkeren Konzentrationserniedrigung von 13 im Gehirn. 13 antagonisiert die exzitative Wirkung des Amphetamins, was aus der um den Faktor 1,5 erniedrigten Motilitätssteigerung bei 13 im Vergleich zu 3 innerhalb eines Zeitraums von 2 Stunden nach i.p. Applikation äquimolarer Dosen hervorgeht (siehe B/VIII). Andererseits gelangt das in 13 maskiert und geschützt vor enzymatischen Inaktivierungsmechanismen vorliegende Amphetamin voll zur Wirkung, wenn der Antagonist 13 seine minimale Inhibitorkonzentration unterschritten hat.

Amphetamin wird im Gehirn erheblich schneller als 13 zu unwirksamen Metaboliten umgewandelt. Trotz der hohen ^{14}C -Gesamtaktivität von 3 im Gehirn nach 2 Stunden (siehe C/VIII) ist die erregende Wirkung zu diesem Zeitpunkt bereits abgeklungen. 13, dessen Konzentration im Gehirn nur 1/10 von 3 nach 2 Stunden beträgt, ruft bis zu 4 Stunden eine Erhöhung der Spontanmotilität hervor, die jedoch niedriger ist als die von 3 bei äquimolarer Dosis. Im Zusammenhang damit darf wohl angenommen werden, daß enzymatische Hydroxylierung des aromatischen Rings der Aminkomponente als Hauptmetabolisierungsweg für 13 nicht in Frage kommt.

13 wird anscheinend primär successive in 3 übergeführt und erst dann zu inaktiven Amphetaminabkömmlingen metabolisiert. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß ein Teil des im Gehirn gefundenen 3 peripher aus 13 gebildet wird. Durch qualitative Untersuchungen der pH 13-Fraktion im Plasma 1/2 Stunde post appl. konnte nämlich neben 13 auch 3 nachgewiesen werden. Auf Grund der sehr niedrigen ^{14}C -Aktivitäten im Plasma und der starken Streuung der Werte wurde keine quantitative Auswertung vorgenommen.

Die Beobachtung, daß 5 mg/kg 13 noch keine Motilitätssteigerung hervorruft, jedoch die Reserpinkatatonie antagonisiert, spricht ebenso wie die NA-Potenzierung am isolierten Vas deferens für eine Mitbeteiligung des Gesamtmoleküls 13 an der zentralen adrenergen Wirkung, die als wesentliches Merkmal für thymoleptische Eigenschaften angesehen wird. Im Gegensatz dazu wird von Methamphetamin in einer Dosis von 0,5 mg/kg sowohl die Spontanmotilität gesteigert, als auch die Reserpinsedation antagonisiert (34). In der gleichen Dosierung steigert es das Abwehrverhalten der Katze (34) und den Kampftrieb der Maus (75). In unseren Versuchen konnte jedoch festgestellt werden, daß 13 das Aggressionsverhalten isolierter Mäuse deutlich hemmt (siehe B/VII), was eindeutig für eine Mitbeteiligung des Gesamtmoleküls 13 an der Wirkung spricht.

Vermutlich wird die antikataleptische Wirkung des abgespaltenen Amphetamins durch 13 auf der Ebene des "Re-uptake"-Vorgangs antagonisiert durch Verhinderung der Freisetzung von NA. Die antikatatone Wirkung bleibt aber erhalten, durch die hohe Affinität von 13 zum NA-Carrier, was zu einer Erhöhung der NA-Konzentration im synaptischen Spalt führt.

Tab. 30: Bestimmung von Metabolitenfraktionen von 13 im Gehirn

Wirkzeit Std.	Tiergewicht (g)	Gesamt- Homogenat (g)	Homogenat* I (g)	Homogenat II (g)	¹⁴ C-Gesamt aktivität (dpm)	Fraktion I (dpm)	Fraktion II (dpm)	Restaktivität Homogenat II (dpm)
0,25	26,8	0,38	0,10	0,28	30254	25456	1309	3802
	27,0	0,37	0,08	0,29	28986	22692	1257	3558
	25,9	0,35	0,12	0,23	27572	22104	1198	4215
0,50	28,2	0,37	0,15	0,22	18650	14755	917	946
	27,5	0,37	0,11	0,26	17428	14066	884	884
	25,6	0,35	0,10	0,25	15730	12053	862	802
1,00	26,0	0,36	0,12	0,24	11924	8342	783	392
	26,0	0,36	0,10	0,24	12670	8720	756	400
	27,2	0,36	0,07	0,29	12824	8639	702	405
2,00	27,4	0,37	0,09	0,28	3644	2602	303	625
	27,0	0,35	0,10	0,25	3276	2514	320	634
	25,8	0,35	0,12	0,25	3484	2538	337	509
4,00	28,0	0,38	0,11	0,27	1862	1480	227	176
	27,0	0,38	0,11	0,27	1878	1302	205	168
	27,0	0,37	0,10	0,27	1864	1307	212	161

* Zur Bestimmung der Gesamtaktivität im Gehirn verwendet

Tab. 31: Bestimmung des Quotienten Substanz 3/ Substanz 13
im Gehirnhomogenat

Wirkzeit Std.	^{14}C -Aktivität		Substanz 3	$\frac{Q}{\bar{x}}$
	Substanz 3 (dpm)	Substanz 13 (dpm)	Substanz 13 (Q)	
0,25	829	618	1,34	1,43
	1208	910	1,33	
	909	557	1,63	
1,00	1075	459	2,34	2,91
	1032	302	3,42	
	1203	404	2,98	
4,00	615	182	3,38	3,56
	665	175	3,79	
	676	192	3,52	

D. Experimenteller Teil

I. Methodik der pharmakologischen Prüfungen

1.) Lokalanästhetische Wirkung

Die Geschwindigkeit der Erregungsleitung wurde an elektrisch gereizten Ventrikelstreifen des Froschherzens (*Rana escul.*) in Anlehnung an die Angaben von Bammer und Rotschuh (5) gemessen. Von der Froschherzkammer wurde in spiraliger Schnittführung ein etwa 1 - 2 mm breiter Streifen hergestellt. Nach Entfernung des reizbildenden Gewebes zeigten die Ventrikelstreifen im allgemeinen keine Spontanätigkeit mehr. Vor Versuchsbeginn kamen die Streifen für 1 Stunde in eine mit Sauerstoff durchperlte Ringerlösung. Nach der Vorbehandlung wurde der Ventrikelstreifen auf ein Reizelektrodenpaar und 2 Paar Ableitelektroden (Abstand 2 cm) aufgelegt, befestigt und in ein Ringer-Bad von 50 ml Inhalt gebracht. Die elektrische Reizung erfolgte an einem Ende des Präparates. Als Reize dienten Rechteckimpulse (0,5 Hz) von 2 ms Dauer und konstanter, doppelter überschwelliger Stärke.

Die Bestimmung der Leitungsgeschwindigkeit erfolgte aus der zeitlichen Verzögerung zweier Aktionsströme, die längs des Streifens von zwei Ableitelektrodenpaaren in einem Abstand von 2 cm abgegriffen wurden. Die Aufzeichnung der Aktionsströme erfolgte über 2 getrennte EEG-Verstärker- und Registriersysteme (Cardioscript, Fa. S. F. Schwarzer, München). Es wurden biphasische Aktionsströme erhalten, deren Spitzenabstände der Zeitmessung zugrunde gelegt wurden.

2.) Untersuchungen am isolierten Vas deferens der Ratte

Die Versuche wurden nach der von Van Rossum und Van den Brink beschriebenen Methode durchgeführt (82, 83).

Männliche SD-Ratten (250 - 350 g) werden durch Nackenschlag getötet und die beiden Vasa deferentia herauspräpariert. Nach Entfernen des mesenteralen Gewebes wird ein 3 - 4 cm langes Organ-

stück an beiden Enden abgebunden, in ein mit Tyrodelösung (NaCl 8,0 g, KCl 0,2 g, CaCl_2 0,2 g, MgCl_2 0,1 g, NaHCO_3 1,0 g, NaH_2PO_4 0,05 g, Glucose 2,0 g, H_2O ad 1000,0 ml pH 7,3) gefülltes Badgefäß (Temperatur: 34°C) eingehängt und mit 1 g vorbelastet. Das Organbad wird mit Carbogen (95 % O_2 und 5 % CO_2) durchperlt. Vor Beginn des Versuches wird das Organ etwa 15 Minuten unter mehrmaligem Auswaschen an die Badflüssigkeit adaptiert. Zur Funktions-
testung des isolierten Organs wird es durch einmalige Noradrenalin-
gabe (Badkonzentration: 8×10^{-5}) gereizt und die Kontraktions-
höhe bestimmt. Im Anschluß daran werden zwei kumulative Dosis-
Wirkungskurven durch Steigerung der Noradrenalin-konzentrationen
im Organbad in geometrisch ansteigender Reihe von $7,68 \times 10^{-8}$ bis
 7868×10^{-8} Mol/l erstellt. Die Muskelkontraktionen werden iso-
metrisch über einen Dehnungsmeßstreifen gemessen und über einen
Verstärker mit einem Kompensationsschreiber registriert.

Nach Aufzeichnung jeder Dosis-Wirkungsbeziehung wird die Badflüs-
sigkeit mehrmals erneuert und die Entspannung des Samenleiters
bis zur Ausgangskontraktion abgewartet (30 Min.). Nun wird die zu
untersuchende Substanz zugesetzt und nach 2 Min. Inkubationszeit
erneut eine kumulative Dosis-Wirkungskurve mit Noradrenalin in
oben aufgeführter Weise ermittelt. Blind- und Testversuch werden
7 x alternierend durchgeführt. Zur Berechnung werden die aus den
steigenden Noradrenalin-konzentrationen resultierenden Kontraktions-
höhen in Relation zum Kontraktionsmaximum gesetzt.

3. Beeinflussung der Hexobarbitalnarkose

Die zu prüfenden Substanzen werden randomisierten, männlichen
NMRI Mäusen in Gruppen von je 7 Tieren i.p. verabreicht. Drei
Minuten später werden 100 mg/kg Hexobarbital-Natrium (Evipan
Natrium^R) i.p. appliziert. Kontrolltiere erhalten anstelle der
zu untersuchenden Substanzen physiologische Kochsalzlösung bzw.
isotonische Glucoselösung.

Gemessen wird die Schlafzeit der Tiere, die mit dem Verlust der
Stellreflexe beginnt. Als wach werden die Tiere angesehen, wenn
sie sich spontan dreimal in einer Minute aus der Rückenlage auf-
richten.

Durch äußere Einflüsse, insbesondere die Umgebungstemperatur, und durch die circadiane Periodik, werden die Schlafzeiten der mit Barbituraten narkotisierten Mäuse erheblich beeinträchtigt (61, 59, 41). Diesen Faktoren wurde bei der Versuchsanordnung durch parallele Kontrollen, Einhaltung der circadianen Periodik sowie klimatisiertem Raum (22°C) Rechnung getragen.

Die Ergebnisse wurden durch t-Test auf Signifikanz geprüft. Da die Schlafzeiten einer lognormalen Verteilung folgten, wurde die statistische Berechnung mit den Logarithmen der Einzelwerte vorgenommen.

4.) Untersuchungen zur Aufhebung der Reserpinsedation

Die Durchführung des "Reserpinumkehrtestes" erfolgt nach der bei Zetler und Mog (89) sowie Zetler, Mahler und Daniel (90) beschriebenen Methode. Verwandt wurden Gruppen von je 10 männlichen NMRI Mäusen im Gewicht von 25 - 30 g. Eine halbe Stunde nach Applikation der Testsubstanz wird Tetrabenazin (40 mg/kg gelöst in 5%iger Ascorbinsäurelösung) i.p. gegeben. 30 Minuten nach der Tetrabenazingabe werden die Tiere innerhalb des Versuchszeitraums von einer Stunde alle fünf Minuten an der Mitte eines vertikal aufgestellten Stabes gesetzt und 40 Sekunden lang beobachtet (Länge des Stabes: 90 cm; Durchmesser 1,5 cm; umwickelt mit 0,2 cm starker Schnur).

Unbehandelte Tiere laufen an diesem Stab nach oben oder nach unten im Gegensatz zu reserpinisierten Tieren, die keine Laufbewegung zeigen und im Zustand der Katatonie sitzenbleiben.

"Reserpin positive" Mäuse dürfen innerhalb dieser 40 Sekunden keine Laufbewegungen ausführen. Sie sind außerdem durch die typischen Symptome der Reserpinwirkung wie erhöhter Muskeltonus, Rigidität, bucklige Haltung, isoliertes Sitzen in den Käfigen, Miosis und Ptosis der Augenlider, stark verminderte Reaktion auf akustische Reize u.v.a. deutlich von unbehandelten Tieren zu unterscheiden.

5.) Beeinflussung der Oxotremorinwirkung

Die Untersuchungen wurden nach der von Jenden (40) beschriebenen Methode durchgeführt.

Zur Ermittlung der Dosis, die einen mindestens 10minütigen Dauertremor hervorruft, wird frisch destilliertes Oxotremorin (124°C/0,1 mm Hg) 25 - 28 g schweren NMRI Mäusen in steigenden Dosen in die Schwanzvene appliziert. Sie liegt bei 208 µg/kg Maus.

30 Minuten vor der Oxotremoringabe werden die zu untersuchenden Verbindungen i.p. appliziert. Zur Differenzierung der antagonistischen Wirkung wird ein Punktsystem verwendet:

2 Punkte für 10minütigen Dauertremor

1 Punkt für unterbrochenen Tremor

1/2 Punkt für schwachen Tremor

Die Beobachtungszeit beginnt eine Minute nach der Oxotremorin-injektion. Die Zuordnung wird von einem neutralen Beobachter vorgenommen. Als Vergleich dient das Antiparkinsonmittel Akineton^R.

6.) Beeinflussung des Kampftriebes isolierter männlicher Mäuse

Männliche Mäuse im Gewicht von 25 - 30 g werden in Einzelkäfige gesetzt. Am 3., 4. und 7. Tag werden sie je zweimal mit einem Eindringling konfrontiert. Sie gelten als brauchbar für den Versuch, wenn sie diesen in allen 6 Tests innerhalb einer Minute angreifen.

Tiere, die innerhalb dieser einwöchigen Isolation keinen einzigen positiven Test zeigen, werden zur Testung der Substanzen verwendet, die den Kampftrieb steigern.

Auf Grund der eindeutigen Ergebnisse konnte auf eine statistische Auswertung verzichtet werden.

7.) Prüfung der Spontanmotilität

Unter Berücksichtigung des circadianen Rhythmus von Mäusen wurde die Testung von Substanzen mit zentral dämpfender Wirkungsqualität in die Wachphase gelegt, wogegen zentral erregende Verbindun-

gen in der Ruhephase getestet wurden (1, 2, 30). Die Einteilung in diese beiden Klassen nahmen wir unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus der Beeinflussung der Hexobarbitalschlafzeit vor. Substanz 14 wurde zusätzlich in der einstündigen Adaptionsphase untersucht.

Wach- und Ruhephase wurden in Vorversuchen ermittelt und ergaben für unsere Versuchstiere ein Aktivitätsmaximum zwischen 22⁰⁰ Uhr und 4⁰⁰ Uhr und ein Aktivitätsminimum zwischen 10⁰⁰ Uhr und 16⁰⁰ Uhr. Auf Inversion dieses Tag-Nachtrhythmus - dies wäre möglich, indem man die Tiere 8 - 10 Tage einem inversen Lichtwechsel (Belichtung während der Nacht und Verdunklung während des Tages) aussetzt - haben wir verzichtet, weil dieser Aufwand bei den gegebenen Räumlichkeiten in keinem Verhältnis zum Aufwand unserer Versuchsanordnung stand.

Die Spontanmotilität wird mit einem "Elektronic Activity Monitor" der Stoelting Company, Chicago, gemessen. Die Fläche der Sensoren beträgt 48 x 25 cm. Durch die Bewegung der Tiere werden Änderungen in dem über den Sensoren aufgebauten Magnetfeld bewirkt. Die ausgelösten Impulse werden verstärkt und registriert. Es wurde im empfindlichsten Meßbereich des Geräts gemessen. Exogene Einflüsse auf die endogene Periodik, wie Licht, Umgebungstemperatur, Luftfeuchtigkeit usw. wurden konstant gehalten.

Randomisierte, männliche NMRI-Mäuse im Gewicht von 25 - 30 g werden in Gruppen zu je 3 Tieren zur Adaption in die beiden Versuchskäfige gebracht. Das Einsetzen der Tiere in die Motilitätskäfige bedingt, wie jede neue Umgebung, zunächst eine Aktivitätssteigerung, die unvorhersehbar schwach oder stark auftritt und als Orientierungsphase bezeichnet wird. Wir registrierten diese Phase über den Zeitraum von einer Stunde und bildeten aus der Anzahl der Impulse der beiden Tiergruppen den Ausgangsquotient (a).

Anschließend erhält die Versuchsgruppe die zu prüfende Substanz, gelöst in isotonischer Glucoselösung, i.p. appliziert, während die Kontrollgruppe lediglich das gleiche Volumen Lösungsmittel i.p. verabreicht bekommt. Die Spontanmotilität wird nun 5 Stunden lang aufgezeichnet. Aus der Motilität der Versuchsgruppe zur Kontrollgruppe wird der Versuchsquotient (b) gebildet, der multipliziert mit a das Endergebnis ergibt.

8.) Hemmung der Monaminoxidase in vitro

10 g frische Rattenleber werden unter Eiskühlung zerkleinert, mit einer Lösung von 8,0 g Triton-X-100 in 100,0 ml 0,067M Phosphatpuffer Sörensen pH 7,2 aufgeschwemmt und bei 0°C im Potter (Braun-Melsungen; Teflon in Glas) durch 10 Auf- und Abwärtsbewegungen bei 1000 U/Min. homogenisiert. Die Suspension wird bei 1000U/Min. 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert und erneut 30 Minuten bei 12000 g zentrifugiert. Mittels Pasteurpipette und Wasserstrahlpumpe wird nun die Fettmanschette abgehoben und das Enzymsolubilisat portionsweise bei -25°C tiefgefroren. Aktivitätsverluste wurden bis 4 Wochen nach Gewinnung nicht beobachtet.

Durch Bestimmung des Proteingehalts nach Lowry (44) wurde das Solubilisat standardisiert.

Die Aktivitätsbestimmung der Monaminoxidase wurde modifiziert nach einer von V. Zeller (91) beschriebenen Methode durchgeführt.

Die bei 37°C temperierten Küvetten werden mit 100 μ l Enzymsolubilisat und steigenden Mengen Substrat (m-Jod-benzylaminxHCl) sowie den zu untersuchenden Substanzen gelöst in 2,8 ml 0,067M Phosphatpuffer pH 7,2 (sauerstoffgesättigt) beschickt. Registriert wird die Zunahme der optischen Dichte bei 253 nm über den Zeitraum von 3 Minuten. Unter den gewählten Versuchsbedingungen verlief die Reaktion im Bestimmungszeitraum linear. Das Umsetzungsprodukt Jod-benzaldehyd erweist sich unter den gegebenen Voraussetzungen als stabil.

9.) Spasmolyse am isolierten Rattenjejunum

Männliche SD-Ratten (250 - 350 g) werden durch Nackenschlag getötet und das Jejunum entnommen. Nach Entfernen des Mesenteriums werden 3 bis 5 cm lange, kotleere Darmabschnitte an beiden Enden abgebunden in ein Tyrodebad von 34°C eingehängt. Die mit Carbogen durchperlte Tyrodelösung hat folgende Zusammensetzung: NaCl 7,0 g, KCl 0,36 g, CaCl 0,275 g, $MgCl_2 \times 6 H_2O$ 0,25 g, $NaHCO_3$ 1,325 g, $NaH_2PO_4 \times 2 H_2O$ 0,1875 g und 2,0 g Glucose ad 1000,0 Aqua dest..

Die Versuche wurden analog den Untersuchungen am Vas deferens durchgeführt. Als Kontraktionsmittel wurde Acetylcholin als Hydrobromid in geometrisch ansteigender Konzentration von $3,13 \times 10^{-10}$ Mol/l bis $1,64 \times 10^{-4}$ Mol/l zugesetzt.

10.) Bestimmung der akuten Toxizität

Die akute Toxizität ist an männlichen NMRI Mäusen im Gewicht von 25 - 29 g ermittelt worden. Dazu werden Gruppen von je 7 Tieren pro Dosis gebildet, die einzeln 60 Minuten lang in Käfigen zur Adaption gehalten werden.

Zu Versuchsbeginn werden den Tieren die zu untersuchenden Verbindungen in geometrisch ansteigenden Dosen einmalig i.p. appliziert. Das Injektionsvolumen betrug dabei 0,1 ml/10g (13, 18) bzw. 0,2 ml/10 g (14, 15, 16, 17) Maus. Tiere, die den Versuch überlebten, wurden 4 Wochen lang beobachtet. Als Lösungsmittel wurde pyrogenfreie, isotonische Glucoselösung verwendet.

Nach Transformieren der prozentualen Sterbehäufigkeit pro Dosis in Probits, wurde die Dosis letalis 50 durch Probitanalyse errechnet (16).

Heterogenitätsprüfung erfolgt mit Hilfe des χ^2 -Test. Obere und untere Vertrauensgrenze wurden für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % nach folgender Formel berechnet:

$$\left. \begin{matrix} m_o \\ m_u \end{matrix} \right\} = m \pm t \cdot \frac{1}{b} \sqrt{\frac{1}{S_{nw}} + \frac{(m - \bar{x})^2}{S_{xx}}}$$

II. Synthese von N-L-Phenylalanyl-L- methylen-¹⁴C-
2-amino-1-phenylpropan modifiziert zur Herstellung
im Mikromaßstab

0,00121 Mol L-Phenylalanin und 0,00121 Mol Phthalsäureanhydrid werden fein miteinander abgerieben und 10 Min. bei 150 - 160°C im Ölbad unter Umrühren und Ausschluß von Feuchtigkeit (CaCl₂-Rohr) umgesetzt. Die Schmelze wird in wenig Methanol gelöst und aus MeOH/H₂O umkristallisiert.

0,00037 Mol N-Phthalyl-phenylalanin und 0,00037 Mol PCl₅ werden in 2 ml absolutem Benzol suspendiert und 15 Stunden unter Rühren auf einem thermostatisierten Heizbad unter Rückflußkühlung zum Säurechlorid umgesetzt. Benzol und Phosphoroxichlorid werden bei 50°C und vermindertem Druck (20 - 25 mm Hg) mit Hilfe einer Mikrodestillationsbrücke abgezogen. Das Reaktionsprodukt wird 12 Stunden im Vakuumexsikator getrocknet.

Unter Kühlung mit Kochsalz/Eismischung wird der in 2 ml absolutem THF gelöste Rückstand bei -15°C vorsichtig einer Lösung von 50 mg Amphetamin* und 91 mg Triäthylamin in absolutem THF zugetropft (2 Tropfen pro Minute) und 15 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das gebildete Amid wird zur Trockne eingedampft, in Chloroform aufgenommen und durch mehrmaliges Ausschütteln mit 2N HCl und 1 N NaOH gereinigt. Nach Trocknen mit Na₂SO₄ wird die Fraktion dünnenschichtchromatographisch auf Reinheit geprüft.

N-L-Phthalylphenylalanyl-2-amino-1phenylpropan wird zur Abspaltung der Phthalyl-Schutzgruppe in 3 ml MeOH gelöst und mit 48 mg Hydrazin in 1 ml MeOH 1 Stunde zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur nützt man vom ausgefallenen Phthalsäureringhydrazid ab, engt das Filtrat ein, nimmt den Rückstand in 3 ml 2N HCl auf und beläßt die Suspension ca. 10 Min. bei 50°C im Heizbad. Nach Abkühlen auf 20°C wird das abgeschiedene Hydrazid abgetrennt und die salzsaure Phase mehrmals mit Aether ausgeschüttelt. Nun wird durch vorsichtiges Zutropfen von 3N NaOH unter Eiskühlung pH 13 eingestellt und mit Chloroform extrahiert. Die organische Phase wird mit Na₂SO₄ getrocknet und nach Abdampfen des Lösungsmittels erhält man das Rohprodukt, das durch Umkristal-

lisieren aus Ligroin N-L-Phenylalanyl-L- methylen- ^{14}C - 2-amino-1-phenylpropan in reiner Form liefert. Nach dünnsschichtchromatographischer Untersuchung wird im Flüssigkeitsscintillationszähler die ^{14}C -Aktivität gegen eine Blindwert- und Standardserie bestimmt.

* Inklusive $450\ \mu\text{Ci}$ ^{14}C -Amphetamin extrahiert aus L- methylene- ^{14}C -Amphetamine sulphate der Fa. Amersham mit einer spezifischen Aktivität von $114\ \mu\text{Ci}/\text{mg}$.

III. Analytische Methoden

Die organischen Extrakte läßt man nach Auftragen auf Kieselgelplatten etwa 15 cm hoch laufen. Nach 10-minütigem Trocknen bei 75°C im Trockenschrank wird mit 10%iger (v/v) Triäthylaminlösung in Aceton vorbehandelt. Im Anschluß daran wird mit Fluorescaminlösung in Aceton (5 mg/100 ml) besprüht und nochmals mit Triäthylaminlösung nachbehandelt. Anhand ihrer unterschiedlichen Fluoreszenzen sind die Stoffe nun bei UV_{350} identifizierbar.

Die Flecken werden markiert und mit Ninhydrinlösung* übersprüht, 10 Minuten bei 75°C getrocknet und die Fleckenbreite anhand der gebildeten Färbungen skizziert. Farbänderungen, die bereits 30 Minuten nach Besprühen eintreten können, werden nicht als Unterscheidungskriterium herangezogen.

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze werden Verdünnungsreihen hergestellt und genau bestimmte Volumina mittels Blutzuckerpipette aufgetragen.

Bei Untersuchungen mit ^{14}C -markierten Verbindungen läßt man einen Standard mitlaufen.

* Ninhydrinlösung: 2 g Ninhydrin, 30 ml Essigsäure 20 %, ad 1000,0 ml Iso-propanol

IV. Stabilitätsprüfungen von 13 in vitro

1.) In künstlichem Magensaft

3 ml künstlicher Magensaft werden mit 100 μ l Stammlösung 13 (30 mg/10 ml) bei 37°C unter ständigem Schütteln inkubiert. Nach unterschiedlicher Einwirkungsdauer werden Proben entnommen, in denen die Reaktion durch Zugabe von 500 μ l 1N HClO₄ gestoppt wird. Nach Zentrifugation bei 4000 g (10 Minuten) wird 1 ml des Überstandes mit 30 ml Titrisol pH 13 versetzt und mit 3 x 30 ml CHCl₃ ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Fraktionen werden nach Trocknen über Na₂SO₄ am Rotavapor bei 50°C zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird in 1 ml CHCl₃ aufgenommen und 10 μ l davon werden zu DC-Untersuchungen auf Kieselgelplatten verwendet.

FM: Methanol/NH₄OH 25 % 99 : 1

Detektionsmittel: 1. Fluram^R 5 mg/100 ml Aceton

2. Ninhydrinlösung

Künstlicher Magensaft (USP XVI, S. 1072)

2,0g NaCl und 3,2 g Pepsin werden in 7,0 ml 36,46%iger (Gew. %) HCl und der für 1000,0 ml nötigen Menge H₂O gelöst und auf einen pH von 1,2 eingestellt.

2.) In künstlichem Darmsaft

Verarbeitung wie in IV/1

Künstlicher Darmsaft (USP XVI, S. 1073)

6,8 g KH₂PO₄ werden in 250 ml H₂O gelöst. Nach Hinzufügen von 190 ml 0,2N NaHO und 400 ml H₂O wird mit 10 g Pankreatin versetzt, gemischt und mit 0,2N NaOH auf pH 7,5 $\pm$ 0,1 eingestellt. Anschließend wird ad 1000,0 ml Wasser aufgefüllt.

3.) Im 9000 g-Überstand von Mäuseleberhomogenat

Männliche NMRI-Mäuse im Gewicht von 24 - 26 g werden durch Luxation der Halswirbelsäule getötet und nach Durchtrennen der Carotiden entblutet. Nach Eröffnen der Bauchhöhle wird die Leber herauspräpariert und in 15,0 ml eisgekühltem 0,15M Phosphatpuffer pH 7,4

aufgenommen. In einem Potter-Elvehjem Homogenisator (Firma Braun/Melsungen) wird sie nun durch 10-maliges Auf- und Abführen des Stempels bei 1000 Upm homogenisiert. Anschließend wird 30 Minuten bei 9000 g in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert und für die weiteren Untersuchungen verwendet.

Jeweils 3 ml Homogenatüberstand werden mit 50 μ l Stammlösung 13 (30 mg/10 ml) inkubiert und unter ständigem leichten Schütteln bei 37°C gehalten. Nach unterschiedlichen Einwirkungszeiten werden Proben entnommen, in denen die Reaktion durch Zusatz von 1,0 ml 1N HClO₄ gestoppt wurde. Nach Zentrifugation bei 4000 g (10 Min.) wird der Überstand mit 50 ml Titrisol pH 13 versetzt. Nun wird mit 3 x 20 ml CHCl₃ ausgeschüttelt, über Na₂SO₄ getrocknet und am Rotavapor bei 50°C eingedampft. Der Rückstand wird in 1 ml CHCl₃ aufgenommen. 10 μ l davon werden zur DC-Untersuchung auf Kieselgelplatten 60 Merck ohne Fluoreszenzindikator aufgetragen.

Fließmittel: Methanol/NH₄OH 25 % 99 : 1

Detektionsmittel: 1. Fluram^R 5 mg/100 ml Aceton

2. Ninhydrin-Lsg.

4.) Nach Inkubation mit Aminopeptidase M (EC 3.4.11.2) aus Schweinenieren

Dem Versuch wurde die für L-Leucin-p-nitranilid angegebene optimale Substratkonzentration von 0,8 mM zugrundegelegt (9).

0,5 ml Trispuffer (50 mM) werden auf 37°C erwärmt. Nach Zugabe von 1 U (250 μ l) Aminopeptidase M wird der Ansatz mit 400 μ l Stammlösung 13 (30 mg/10 ml) versetzt und geschüttelt. Nach unterschiedlichen Einwirkungszeiten werden Proben entnommen, in denen die Reaktion durch Zusatz von 1,0 ml 1N HClO₄ gestoppt wurde. Nach Zentrifugation bei 4000 g (10 Min.) wird der Überstand mit 50 ml Titrisol pH 13 versetzt. Nun wird mit 3 x 20 ml CHCl₃ ausgeschüttelt, über Na₂SO₄ getrocknet und am Rotavapor bei 50°C eingedampft. Der Rückstand wird in 1 ml CHCl₃ aufgenommen. 10 μ l davon werden zur DC-Untersuchung auf Kieselgelplatten aufgetragen.

Fließmittel: Methanol/NH₄OH 25 % 99 : 1

Detektionsmittel: 1. Fluram^R 5 mg/100 ml Aceton

2. Ninhydrin-Lösung

Trispuffer pH 7,2* (50 mM):

1,21 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan werden in 50 ml Wasser gelöst mit 90 ml 0,1N HCl versetzt und mit Aqua bidest. ad 200,0 ml aufgefüllt.

Aminopeptidase M (Boehringer, Mannheim):

5 mg/1 ml als Kristallsuspension enthalten 4 U/ml

V. Methodik der Untersuchungen zu Pharmakokinetik und Metabolismus von 13 bzw. 3

1.) Rectale und renale Eliminationsrate

Zur Bestimmung der rectalen und renalen Eliminationsrate wurde männlichen NMRI-Mäusen 30 mg/kg ^{14}C -markiertes 13 i.p. appliziert. Die dabei verabreichte ^{14}C -Aktivität betrug ca. 50 $\mu\text{Ci/kg}$ Maus.

Nach Applikation der Substanz hielten wir die Tiere einzeln in Stoffwechselkäfigen und entnahmen nach 4, 8, 12, 24 und 48 Stunden die gesammelten Ausscheidungsprodukte.

Zur Bestimmung der ^{14}C -Aktivität im Faeces wurden die Exkremente 12 Stunden bei 60°C getrocknet und anschließend im Packard Tri Carb Sample Oxidizer verbrannt. Das dabei vom "Szintillationscocktail" absorbierte $^{14}\text{CO}_2$ ergibt nach Messen im Flüssigkeitsszintillationszähler die prozentuale fäcale Ausscheidung der applizierten Gesamtaktivität.

Der Harn wurde mit Aqua dest. aus dem Sammelkolben gespült und auf 50,0 ml aufgefüllt. 100 μl davon wurden zur Bestimmung der renalen Eliminationsrate im Packard Tri Carb Liquid Scintillation Spectrometer gegen einen inneren Standard* vermessen.

* Radiocarbon Standard for Sample Oxidizers $8,68 \times 10^5 \pm 3 \%$ dpm/ml

2.) Ganztier-Autoradiographie

Männliche NMRI-Mäuse im Gewicht von 25 - 28 g wurden 12 Stunden vor Versuchsbeginn nüchtern gehalten. Trinkwasser stand ihnen ad libitum zur Verfügung.

Pro Gramm Tiergewicht wurde 0,01 ml ^{14}C -markierte Wirkstofflösung i.p. bzw. p.o. appliziert, was einer Aktivität von ca. 50 $\mu\text{Ci/kg}$ Maus und einer Dosis von 19,4 mg/kg (3) bzw. 30 mg/kg (13) entsprach. Nach Verabreichung hielten wir die Tiere bis zur Weiterverarbeitung einzeln in Käfigen.

Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 Stunden) nach der Applikation wurden die Mäuse durch i.v.-Injektion (Schwanzvene) von T61^R (ca. 20 - 30 μ l)* getötet. Dabei tritt der Tod nach 1 - 2 Sekunden absolut excitationslos ein, ohne dabei eine Körperstarre in unphysiologischer Haltung zu verursachen.

In quaderförmigen Metallformen werden die Tiere nun zur Fixierung ihrer natürlichen Körperhaltung in Carboxymethylcellulose-Gel eingegossen und bei -70°C (Aceton/Trockeneis) tiefgefroren. Danach werden die Seitenwände des Metallbehälters abgeschraubt und der Block mit dem Bodenteil auf dem Schraubstock des Mikrotoms befestigt. Nach ca. 12 - 15 Stunden - solange dauert es bis der tiefgefrorene Carboxymethylcelluloseblock mit dem eingebetteten Versuchstier die Temperatur des Kryostaten (-15 bis -20°C) angenommen hat - werden Longitudinalschnitte verschiedener Stärke (30 μ , 50 μ , 100 μ) durch die gewünschten Ebenen gelegt. Um die wichtigsten Organe zu erfassen, legten wir pro Tier 8 - 10 Schnittebenen. Die Schnittstärke war dabei durch elektronische Höhen- und Tiefeneinstellung des Mikrotoms regulierbar. Jede neue Schnittebene wurde vorher photographiert, um einmal die Zuordnung bestimmter autoradiographischer Schwärzungen zum anatomischen Substrat zu erleichtern, und zum andern hierdurch etwa vorhandene Artefakte (Leerstellen infolge Abbröckelns von Organteilen, Darminhalten usw.) ursächlich klären zu können.

Aufgezogen auf Tesafilm war es möglich, den Ganztierschnitt unversehrt und faltenlos abzunehmen. Die Präparate wurden nun 15 - 20 Stunden im Kryostat getrocknet, und unter Vermeidung jeglichen Eindringens von Feuchtigkeit auf den photographischen Film (Agfa-Gevaert Röntgenfilm Osray T₄ 18 x 24 cm) mittels zweier starker Aluminiumplatten gepreßt und verklebt oder verschraubt. Zur Exposition wurden die Pressen in einem Tiefkühlschrank bei -20 bis -25°C 14 Tage gelagert. Die optimale Expositionszeit, die ja entscheidend abhängt vom Aktivitätsgehalt im Tier zum Zeitpunkt der

* 1 ml T61^R enthält: 0,2 g N-2-(m-Methoxyphenyl)-2-äthyl-butyl-(1)-butyramid, 0,05 g 4,4' Methylene-bis-cyclohexyl-trimethylammoniumjodid, 0,005 g 4'-Butylaminobenzoyl-2-dimethylaminoäthanol-HCl in wässr. Lösung.

Tötung, vom Verteilungsmuster der Aktivität innerhalb des gesamten Organismus sowie von der Energie der Strahlung des verwendeten Nuklids und der Empfindlichkeit des Röntgenfilms, wurde in Vorversuchen ermittelt und lag bei 14 Tagen.

Die Entwicklung des belichteten Films erfolgte nach den vom Hersteller angegebenen Entwicklungsbedingungen.

3.) Verteilung in verschiedenen Organen und Körperflüssigkeiten

Männliche NMRI-Mäuse im Gewicht von 25 - 30 g hält man 12 Stunden vor Versuchsbeginn nüchtern. Trinkwasser steht ihnen ad libitum zur Verfügung. Pro Gramm Tiergewicht werden 0,01 ml ^{14}C -markierte Wirkstofflösung i.p. appliziert, was einer Aktivität von ca. 50 $\mu\text{Ci/kg}$ Maus und einer Dosis von 19,4 mg/kg (3) bzw. 30 mg/kg (13) entspricht. Nach Verabreichung setzt man die Tiere einzeln in Stoffwechselkäfige und sammelt die Exkremente zur Bestimmung der Aktivität in den Ausscheidungsprodukten (D.V/1).

Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 Stunden) nach Applikation werden die Tiere durch Luxation des Halswirbels getötet und entblutet. Das Volumen des gesammelten Vollblutes einschließlich 1 ml 1%ige Na-oxalatlösung wird ermittelt, und das nach Zentrifugation gewonnene Plasma zur Bestimmung der ^{14}C -Aktivität verwendet. Nach möglichst vollständigem Entbluten des Tieres werden Gehirn, Leber, Herz, Nieren, Galle, Magen, Lunge, Hoden, Dick- und Dünndarm herauspräpariert, gewogen und nach 24-stündigem Trocknen bei 60°C zur quantitativen Aktivitätsbestimmung des Organs im Verbrennungsautomat**** (Fa. Packard) hergenommen. Das dabei vom "Scintillationscocktail"* absorbierte ^{14}C -Kohlendioxid wird im Flüssigkeitsscintillationszähler*** gegen den Mittelwert einer ^{14}C -Standardserie** und einer Leerwertserie gemessen. Die

* Spezielles Gemisch bestehend aus 12 ml Permaflour V und 8 ml Carbosorb.
Beide Flüssigkeiten werden von der Fa. Packard ohne Angabe der Zusammensetzung geliefert.

** Radiocarbon Standard for Sample Oxidizers $8,68 \times 10^5 \pm 3 \text{ \% dpm/ml}$

*** Packard Tri Carb Liquid Scintillation Spectrometer

**** Packard Tri Carb Sample Oxidizer

pro Organ ermittelten dpm werden zur applizierten Gesamtaktivität ins Verhältnis gesetzt, in Prozent angegeben. Der Bestimmung des Isotopengehalts im Plasma legten wir die Blutmengennormalwerte für Mäuse (58) und das ermittelte Verhältnis Vollblut/Plasma zugrunde.

4.) Bestimmung von Metabolitenfraktionen im Gehirn

Männliche NMRI-Mäuse im Gewicht von 25 - 28 g wurden 12 Stunden vor Versuchsbeginn nüchtern gehalten. Trinkwasser stand ihnen ad libitum zur Verfügung.

Pro Gramm Tiergewicht wurde 0,01 ml ^{14}C -markierte Wirkstofflösung i.p. appliziert, was einer Aktivität von ca. 50 $\mu\text{Ci/kg}$ Maus und einer Dosis von 30 mg/kg entspricht.

Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 Stunden) nach Applikation werden die Tiere durch Luxation des Halswirbels getötet und nach Durchtrennen der Carotiden vollständig entblutet. Nach Abheben der Schädeldecke wird das Gehirn herauspräpariert, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und im Mikro-Dismembrator homogenisiert (= Gesamthomogenat). Ein Teil davon wird entnommen, genau gewogen (= Homogenat I) und im Packard Tri Carb Sample Oxidizer verbrannt. Damit erfolgt die Bestimmung der ^{14}C -Gesamtaktivität im Gehirn.

Der Rest (= Homogenat II) wird zur Isolation von Metaboliten mit 2 ml 1N HCl denaturiert und 10 Min. bei 4000 g zentrifugiert. Der Niederschlag wird weitere zweimal mit je 2 ml 1N HCl eluiert. Die vereinigten salzsauren Fraktionen werden zur Entfernung von Lipiden mit Äther ausgeschüttelt, der Niederschlag wird zur Bestimmung der Restaktivität nach Trocknen bei 60°C der Combustion unterworfen.

Die wässrige Phase wird nun durch vorsichtiges Zutropfen von 1N NaOH unter Eiskühlung auf pH 13 gebracht und die dabei ausfallenden Basen mit CHCl_3 eluiert (= Fraktion I). Die quantitative Ausschüttelung wird durch Vermessen der organischen Phase auf ^{14}C -Aktivität kontrolliert. Ist im Elutionsmittel keine ^{14}C -Aktivität mehr meßbar, wird die wässrige Phase auf pH 9 gebracht und zur Isolierung der Metaboliten mit phenolischem Charakter wieder

mehrere Male mit CHCl_3 ausgeschüttelt (= Fraktion II). Der Rückstand bildet die wässrige Fraktion III. In sämtlichen Fraktionen wird nun die ^{14}C -Aktivität bestimmt und Fraktion I zusätzlich dünnenschichtchromatographisch aufgetrennt. Die Bestimmung des Quotienten Substanz 3 : Substanz 13 erfolgt durch Verbrennung der ausgekratzten Kieselgelzonen im Verbrennungsautomat unter Berücksichtigung eines Standards und Blindwerts.

Fließmittel: 1. Methanol/ NH_4OH 25 % 99 : 1

2. Methanol/ Chloroform/ Cyclohexan 30 : 50 : 30

Detektionsmittel: 1. Fluram^R (5 mg/100 ml Aceton) + UV_{350}

2. Ninhydrinlösung (2 g Ninhydrin, 30 ml 20%ige Essigsäure, 970 ml Isopropanol)

Adsorptionsmittel: Kieselgel 60 Merck (ohne Fluoreszenzindikator)

Zusammenfassende Beurteilung

Die amidartige Verknüpfung von L-Phenylalanin mit adrenotropen β -Phenylalkylaminen (1 - 10) führte zu Verbindungen, deren leitungshemmende Wirkung 2 - 7 mal stärker ist, als die von Procain. Die adrenomimetischen Wirkungsqualitäten der Ausgangsbasen 1 - 10 gehen dabei mit Ausnahme von 13 bei allen Substanzen verloren, die NA-verstärkende Wirkung bleibt jedoch bei 15 - 18 erhalten. Für den Wirkungsvorgang wird ein Eingriff in den "Re-uptake"-Mechanismus präsynaptischer, nervaler Strukturen diskutiert.

13, 15, 16 antagonisieren die Tetrabenazinkatalepsie; sie ähneln auf Grund ihrer zusätzlichen lytischen und NA-verstärkenden Effekte stark dem pharmakologischen Wirkungsbild von Antidepressiva der Desipraminreihe.

Die Methylierung des chemischen Grundgerüsts am Amidstickstoff (14, 17, 18, 19, 20) führt entweder zu Wirkungsverlust oder Wirkungsumkehrung. 19 und 20 zeigen nur noch lokalanästhetische Eigenschaften, während 17 und 18 trotz ihrer NA-potenzierenden Wirkung die Hexobarbitalschlafzeit signifikant verlängern. Substanz 14 besitzt ausschließlich lytische Wirkungsqualitäten. Neben ihrer leitungshemmenden Eigenschaft verlängert 14 die Evi-pan-Narkose, antagonisiert die NA-Wirkung am Vas deferens und den Acetylcholinspasmus am Rattenjejenum. Zentrale anticholinerge Eigenschaften konnten bei 14 nicht gefunden werden. Die Hemmung der Monaminoxidase ist bei 14 nichtkompetitiv und erfolgt erst in relativ hoher Konzentration. Damit wäre die Substanz im Gegensatz zu den Verbindungen 13, 15, 16, die den Thymoleptika nahe stehen, in die Gruppe der Neuroleptika einzuordnen.

13, der wirksamste Vertreter der thymoleptischen Verbindungen, zeigte in einer erweiterten pharmakologischen Prüfung neben zentralen anticholinergen bzw. dopaminergen Eigenschaften (Oxotremorinantagonismus) in einer Dosierung von 30 mg/kg eine signifikante Steigerung der Spontanmotilität, die jedoch bei Dosierungsniedrigung auf 5 mg/kg unter Beibehaltung seiner antikatalep-

tischen Wirkung verlorenging. Periphere anticholinerge Effekte (Spasmolyse) und MAO-Hemmung sind mit denen von 14 vergleichbar.

In vitro- und in vivo-Versuche zu Pharmakokinetik und Biotransformation bewiesen, daß die pharmakologischen Ergebnisse, die mit Verbindung 13 erzielt wurden, aus den Wirkungen des Gesamtmoleküls 13 und seinem Spaltprodukt Amphetamin resultieren.

13 erwies sich in Vorversuchen mit künstlichem Magen- und Darmsaft als stabil. Die Inkubation mit Leberhomogenat oder Amino-peptidase M ergab dagegen im Wirkungszeitraum von 4 Stunden deutliche Mengen der Spaltprodukte Phenylalanin und Amphetamin.

Zur Aufklärung von Pharmakokinetik und Metabolismus wurde N-L-Phenylalanyl-L-methylen-¹⁴C-2-amino-1-phenylpropan (13) synthetisiert. Verteilungsstudien mittels Ganztier-Autoradiographie zeigten eine Anreicherung von 13 und 3 in Gastrointestinaltrakt, Leber, Niere, Galle und Gehirn, die nach i.p. Applikation erheblich stärker ausgeprägt war als nach oraler Verabreichung.

Die hohen Aktivitäten in Niere und Gastrointestinaltrakt deuteten eine renale und rectale Elimination als Hauptausscheidungs-
weg an, was für 13 in gesonderten Stoffwechseluntersuchungen bestätigt wurde. Nach 8 Stunden waren 54 % der applizierten Gesamtaktivität via Harn und 11 % rectal eliminiert. Nach 48 Stunden war die Ausscheidung beendet.

Metabolisierungsstudien an Mäusen, denen ¹⁴C-markiertes 13 i.p. appliziert wurde, zeigten daß bereits nach 1/4 Stunde die maximale Konzentration im Gehirn erreicht ist.

Gesamtmolekül und Spaltprodukt 3 wurden nach dünnschichtchromatographischer Trennung quantitativ bestimmt und ergaben nach 1/4 Stunde einen 3/13-Quotienten von 1,43, der nach 4 Stunden auf 3,56 anstieg.

Da die Spontanmotilität von 13 im Gegensatz zu 3 (Abklingen der Wirkung nach 2 Stunden) trotz zunehmender Amphetaminkonzentration über einen Zeitraum von 4 Stunden nahezu konstant blieb, nehmen wir einen Antagonismus von 13 gegenüber 3 auf der Ebene des "Re-uptake"-Vorgangs an.

Literaturverzeichnis

- 1.) J. Aschoff
Arch. Physiol. 254, 262 (1952)
- 2.) J. Aschoff
Zeitschr. Tierpsychol. 15, 1 (1958)
- 3.) J. Axelrod, L. G. Whitby, G. Hertting
Science 133, 383 - 384 (1961)
- 4.) Z. M. Bacq
Fundamentals of Biochemical Pharmacology, S. 282, 283, 285,
Pergamon Press, New York (1971)
- 5.) H. Bammer, K. E. Rotschuh
Naunyn-Schmiedeberg's-Arch. Pharmacol. exp. Pathol. 214,
367 (1952)
- 6.) A. Barnett, H. Gloge, R. I. Taber
Federat. Proc. 26, 509 (1967)
- 7.) D. Bente, E. Schmid-Claudy
Arzneimittel-Forsch. 19, 465 (1969)
- 8.) F. Benvenuti, A. Bonaccorsi, S. Garattini
J. Pharmacy Pharmacol. 19, 477 (1967)
- 9.) H. U. Bergmeyer
Methoden der enzym. Analyse, 3. Aufl. Bd. I. 995 (1974)
- 10.) M. H. Bickel
Fortschr. Arzneimittel-Forsch. 11, 140 (1968)
- 11.) M. P. Blaustein, D. E. Goldmann
Science 153, 429 (1966)
- 12.) D. F. Bogdanski, F. Sulser, B. B. Brodie
J. Pharmac. exp. Ther. 132, 176 - 182 (1961)

- 13.) W. Brandt
Dissertation, München (1969)
- 14.) v. F. Th. Brücke, O. Hornykiewicz
Pharmakologie der Psychopharmaka, Springer Verlag,
Berlin, Heidelberg, New York (1966)
- 15.) D. D. Cairncross, S. Gershon, J. D. Gust
J. Neuropsychiat. 4, 224 (1963)
- 16.) L. Cavalli-Sforza, Biometrie
G. Fischer Verlag, Stuttgart S. 153 (1972)
- 17.) J. T. Coyle, S. H. Snyder
Science 166, 899 - 901 (1969)
- 18.) H. J. Dengler, H. E. Spiegel, E. O. Titus
Nature 191, 816 - 817 (1961)
- 19.) H. J. Dengler, H. E. Spiegel, E. O. Titus
Science 133, 1072 - 1073 (1961)
- 20.) J. C. Denmark, J. D. Powell-David, S. C. McComb
Br. J. clin. Pract. 15, 523 (1961)
- 21.) R. Domenjoz, W. Theobald
Arch. int. Pharmacodyn. 120, 450 (1959)
- 22.) B. Dubnik, G. A. Leeson, M. Chessin, Ch. C. Scott
Arch. int. Pharmacodyn. 126, 194 (1960)
- 23.) M. Eigen, L. Demaeyer
Neurosciences Res. Progr. Bull. 9, 300 (1971)
- 24.) W. Endres
Dissertation Universität München (1969)
- 25.) G. M. Everett, J. C. Davin, J. E. P. Toman
Fed. Proc. 18, 388 (1959)
- 26.) M. B. Feinstein
J. Gen Physiol. 48, 357 (1964)

- 27.) E. Fischer, B. Heller, M. Nachon, H. Spatz
Arzneimittelforsch. 25, 132 (1975)
- 28.) S. Garattini, A. Giachetti, L. Pieri
Med. exp. 3, 315 - 320 (1960)
- 29.) M. N. Gleason, R. E. Gosselin, H. C. Hodge, R. P. Smith
III. edition, The Williams and Wilkins, Co. Baltimore
(1969)
- 30.) R. Gösswald
Medizin und Chemie, VII, 189 - 196 (1963)
- 31.) F. Heer, J. Stewart, M. P. Charest
Arch. int. Pharm acodyn. 134, 328 (1961)
- 32.) G. Hertting, H. E. Spiegel, E. O. Titus
Nature 191, 816 - 817 (1961)
- 33.) F. Hoffmeister, H. Kreiskott, W. Wirth
Arzneimittelforsch. 14, 482 - 486 (1964)
- 34.) F. Hoffmeister, W. Wuttke, G. Kroneberg
Arzneimittelforsch. 19, 846 - 858 (1969)
- 35.) F. Hoffmeister
Arzneimittelforsch. 19, 458 (1969)
- 36.) P. Holtz, H. Balzer, E. Westermann, E. Wezler
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 231,
333 (1957)
- 37.) A. Hürlimann, W. Haefely, H. Thoenen
Helv. physiol. pharmac. Acta 21, 24 (1963)
- 38.) P. Hunt, M. -H. Kannengiesser, J. -P. Raynaud
J. Pharm. Pharmac. 26, 370 (1974)
- 39.) P. A. Jansen, A. H. Jageneau, C. S. E. Niemegeers
J. Pharmacol. exp. Therap. 129, 471 (1960)

- 40.) D. J. Jenden
Selected Pharmacol. Testing Meth., Marcel Dekker INC,
New York, Bd. III, 337 (1968)
- 41.) E. Komlos, L. Foldes
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 236,
335 (1959)
- 42.) G. B. Leslie, D. R. Maxwell
Nature 202, 97 - 98 (1964)
- 43.) H. Lineweaver, D. Burk
J. Amer. chem. soc. 56, 658 (1934)
- 44.) O. H. Lowry
J. Biol. Chem. 193, 265 (1961)
- 45.) S. Mahadevan, A. L. Tappel
J. Biol. Chem. 242, 2369 (1967)
- 46.) A. J. Mandell, C. Markham, W. Fowler
Calif. Med. 95, 12 (1961)
- 47.) A. Mandell, W. Fowler
Archs. Neurol. Chicago 6, 81 (1962)
- 48.) N. Matussek, E. Rütger, E. O. Titus
Arzneimittelforsch. 14, 503 (1964)
- 49.) P. Ohlin, B. C. R. Strömblad
Br. J. Pharmacol. Chemotherapy 20, 299 (1963)
- 50.) M. K. Paasonen, A. Pletscher
Experientia 15, 477 - 479 (1959)
- 51.) F. Pardal, M. M. Lopez, C. F. Pardal, J. Fischer
1er Congr. Argent. Farmacol. (1972)
- 52.) A. Petter, H. Schönenberger, W. Zvez
Pharmazie 27, 250 (1972)

- 53.) A. Pletscher,[¶] K. F. Gey, P. Zeller
Fortschr. Arzneimittelforsch. 2, 417 (1960)
- 54.) A. Pletscher
Arzneimittelforsch. 14, 479 - 482 (1964)
- 55.) W. Pöldinger
Med. Kurse ärztl. Fortbildung 10, 501 (1969)
- 56.) H. Pohlmeier, N. Matussek
Arch. Psychiat. Nerv.-Krankh. Z. ges. Neurol. Psychiat. 207,
174 - 184 (1965)
- 57.) G. P. Quinn, P. A. Shore, B. B. Brodie
J. Pharmac. exp. Ther. 127, 103 - 109 (1959)
- 58.) H. M. Rauen
Biochem. Taschenbuch 2. Aufl. Bd. II, 342
- 59.) J. Raventos
J. Pharmacol. exp. Ther. 64, 355 (1938)
- 60.) R. H. Rech, M. E. Hale
Fedn. Proc. Fedn. Am. Socs. exp. Biol. 22, 568 (1963)
- 61.) A. Reinberg, F. Halberg
Ann. Rev. Pharmacol. 11, 455 (1971)
- 62.) A. Ribbentrop, W. Schaumann
Arzneimittelforsch. 15, 857 - 862 (1965)
- 63.) H. Schönenberger, W. Siekmann, R. Brinkmann
Arzneimittelforsch. 17, 744 (1967)
- 64.) H. Schönenberger, A. Petter, W. Zwez
Pharm. Act. Helv. 42, 593 (1967)
- 65.) H. Schönenberger, A. Petter, D. Beck, W. Endres,
H. J. Servatius
Pharmazie 31, 882 (1976)

- 66.) M. A. Shaw, H. W. Peel
J. Chromatography 104, 201 - 204 (1975)
- 67.) P. A. Shore, B. B. Brodie
Psychotropic drugs, Elsevier, Amsterdam (1957)
- 68.) E. B. Sigg
Can. psychiat. Ass. J. 4, 75 - 85 (1959)
- 69.) E. B. Sigg, eds. I. H. Nodine and S. H. H. Moyer;
Lea and Febiger, Philadelphia 671 - 678 (1962)
- 70.) F. Sjöpvist, J. R. Gillette
Life sci. 4, 1031 - 1036 (1965)
- 71.) E. E. Smith, J. T. Kaufmann, A. M. Rutenburg
J. Biol. Chem. 240, 1718 (1965)
- 72.) P. Stern
Pharmazie 21, 711 - 712 (1966)
- 73.) R. R. Strang
Br. med. J. 1965/II, 33
- 74.) F. Sulser, J. Watts, B. B. Brodie
Ann. N. Q. Acad. sci. 96, 279 - 286 (1962)
- 75.) R. E. Tedeschi, D. E. Tedeschi, A. Mucha, L. Cook,
P. A. Mattis, E. J. Fellows
J. Pharmacol. exp. Ther. 125, 28 - 34 (1959)
- 76.) W. Theobald, H. A. Kunz, C. Morpurgo, G. Stenger,
G. Wilhelm
Arch. int. Pharmacodyn. 148, 560 (1964)
- 77.) J. F. Thiercelin, C. Jacquot, J. R. Rapin, Y. Cohen
Arch. int. Pharmacodyn. 220, 153 - 163 (1976)
- 78.) H. Thoenen, A. Hürlimann, W. Haefely
J. Pharmac. exp. Ther. 144, 405 - 414 (1964)
- 79.) H. Tim
Brain nerve 13, 931 - 936 (1963)

- 80.) E. O. Titus, H. E. Spiegel
Fedn. Proc. Fedn. Am. Socs. exp. Biol. 22, 179 (1962)
- 81.) U. Trendelenburg
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 271, 29 (1971)
- 82.) J. M. Van Rossum, F. G. den Brink
Arch. int. Pharmacodyn. 143, (1963)
- 83.) J. M. Van Rossum
Arch. int. Pharmacodyn. 143, 299 (1963)
- 84.) J. B. Vieth, E. Holm, P. R. Knopp
Arch. int. Pharmacodyn. 171, 323 (1968)
- 85.) A. Völkel, J. C. Dressler
Nervenarzt 30, 322 - 325 (1959)
- 86.) D. F. H. Wallach
The Plasma Membrane: Dynamic Perspectives Genetics and
Pathology, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1972)
- 87.) D. Winne
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pathol. exp. Ther. 247, 278 (1964)
- 88.) H. C. Y. Yen, R. L. Stanger, N. Millmann
J. Pharm. exper. Therap. 122, 85A (1958)
- 89.) G. Zetler, E. Mog
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Ther. 232, 442 (1958)
- 90.) G. Zetler, K. Mahler, F. Daniel
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 238,
468 (1960)
- 91.) V. Zeller, G. Ramachander, E. A. Zeller
J. Med. Chem. 8, 440 (1965)
- 92.) H. F. Zipf
Pharmac. Acta Helvetiae 42, 480 (1967)

Lebenslauf

D i e t e r L o r e n z
B e c k

geboren am 11.4.1943 in Neuburg/Do.
als Sohn des Oberstabsfeldwebels
Sebastian Beck und seiner Ehefrau
Maria, geb. Heilmeier
Seit 1966 verheiratet mit Monika
Beck-Eichinger, geb. Eichinger
2 Kinder

S c h u l b i l d u n g :

1949 - 1953 Volksschule Neuburg/Do.
1953 - 1960 Gymnasium Dillingen/Do.
1960 - 1963 Gymnasium Neuburg/Do.

Reifeprüfung:

Juli 1963 in Neuburg/Do.

B e r u f s a u s b i l d u n g :

Praktikantenzeit:

1963 - 1965 Marienapotheke in
Neuburg/Do.

Pharmazeutisches Vorexamen:

September 1965 in Augsburg

Studium der Naturwissenschaften:

WS 1965 - SS 1967

Studium der Pharmazie:

WS 1967 - SS 1970

Pharmazeutisches Staatsexamen:

SS 1970

Kandidatenzeit:

November 1970 - Oktober 1971 in
der Kreuz-Apotheke, Schrobenhausen
November 1971

Bestallung als Apotheker:

Juli 1972 bis Oktober 1978 unter
Anleitung von Herrn Professor
Dr. H. Schönenberger am Institut
für Pharmazie und Lebensmittel-
chemie

Wissenschaftliche Arbeit:

Berufliche Tätigkeit:

Seit 1.12.1974 Verwalter einer
wiss. Ass.stelle am Institut für
Pharmazie und Lebensmittelchemie
der Universität München

